平成21年度農政課題解決研修

DNA品種判別技術

研修テキスト

独立行政法人農業・食品産業技術研究機構
果樹研究所

目 次

1日目　10月19日(月)

1. DNA品種判別技術の手法と事例　10:00～11:00
　果樹ゲノム研究チーム・チーム長　山本俊哉　…… 1

2. 種苗法と品種保護に関する最近の情勢　11:00～12:00
　種苗管理センター品種保護対策課・課長　田平雅人…… 22

3. DNA品種識別技術実習　13:00～16:00
　（参考資料 その1）

4. DNA実験設備見学と討議　16:15～17:15
　（資料なし）

2日目　10月20日(火)

5. DNAマーカーによる早期選抜と品種判別技術　9:00～10:00
　果樹ゲノム研究チーム・上席研究員　清水徳朗　…… 55

6. DNAマーカー計算ソフトウェア　10:00～11:45
　果樹ゲノム研究チーム・主任研究員　藤井　浩　…… 70

7. 総合討論　11:45～12:00
　（資料なし）

参 考 資 料

その1. DNA品種識別技術の実習マニュアル

その2. DNAマーカーによる果樹・果実品種判別

１．DNA品種判別技術の手法と事例

果樹ゲノム研究チーム・チーム長

山本俊哉

National Agriculture and Food Research Organization
農業・食品産業技術総合研究機構

NARO 農研機構

DNA品種判別技術の手法と事例

農研機構・果樹研究所
果樹ゲノム研究チーム長
山本　俊哉

農研機構は食料・農業・農村に関する研究開発などを総合的に行う我が国最大の機関です

ヒトでのDNA鑑定の利用例

NARO 農研機構

・ヒトでのDNA鑑定は、STR（SSRと同義）等で行われている

- ・ロシア帝国ロマノフ王朝最後の皇帝ニコライ二世の遺骨のDNA鑑定
- ・中国残留孤児、朱桂琴さんの身元判明、兄とのDNA鑑定で
- ・横田めぐみさん、北朝鮮の少女は娘と断定、DNA鑑定で一致
- ・米シャトル墜落、遺体搬送、身元判明へ

・ヒトでは裁判の証拠としてDNA鑑定が使われている

故イブ・モンタンさん認知裁判で遺体発掘、DNA鑑定へ

シャンソンの名曲「枯葉」で知られる歌手で俳優でもあった故イブ・モンタンさんの遺体が、永眠するパリ市内の墓地から掘り起こされることになった。
モンタンさんの遺児だと主張する女性の訴えをDNA鑑定で確認するためで、、、、、

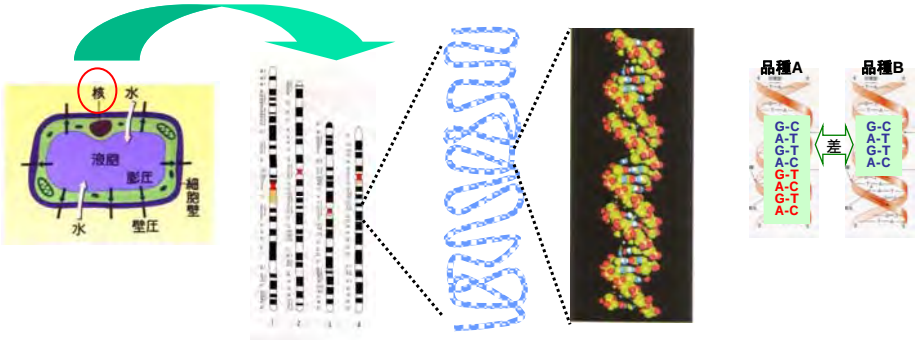
→ モンタン氏の実子ではない、DNA鑑定で結論

「イブ・モンタンは、オロール・ドロサールの父親ではない」――イブ・モンタンさんについてDNA鑑定を行っていた3人の解剖医は、簡潔にこう断じた。

DNA*とは？-遺伝子の本体-

農研機構 NARO

*DNA＝デオキシリボ核酸



細胞の中に核があります

核の中に染色体があります

染色体はDNAから構成され小さく折りたたまれています

DNAは二重らせん構造になっています

DNAの並び方や長さの差で、品種を識別することができます

DNAを用いることにより、正確な分析・鑑定ができる

DNA品種判別技術をどのような場面で使うのか？

農研機構 NARO

・登録品種の育成者権保護
　権利侵害、海賊版果実の抑止

・果実生産者の保護
　一般農家？　法人？

・消費者の安全・安心

・果実の加工・流通
　製品の品質管理

・新しい展開！？

Clip Art Factoryから

モモの品種

農研機構 NARO

外観からの品種を見分けることは、非常に困難です。

モモの写真

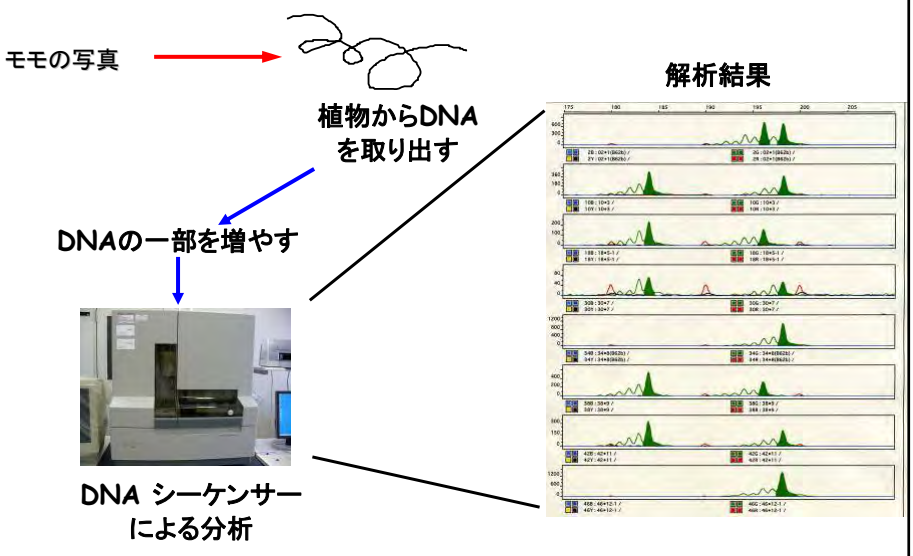
白鳳　　あかつき　　川中島白桃

これが、現在の生産第1、2、3位の品種ですが、、、、
外見から品種の判別ができる人はいません。
食べても品種の区別はつきません。

現在では、SSRと言われるDNAマーカーで
主要な栽培品種（約50品種）が識別可能になっています

DNAシーケンサーによるSSR分析

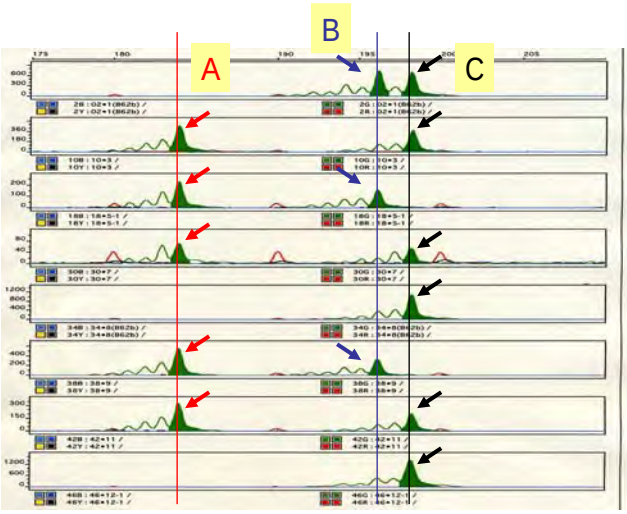
農研機構 NARO



解析の方法

農研機構 NARO

品種1　BC
品種2　AC
品種3　AB
品種4　AC
品種5　CC
品種6　AB
品種7　AC
品種8　CC
同じ



モモの品種鑑定

農研機構 NARO

モモの写真

DNA1	BC	BB	AB
DNA2	XX	XX	XY
DNA3	SS	TT	TT
DNA4	LM	LL	LM

白鳳　あかつき　川中島白桃

データベース

	モモ1	あかつき	モモ2	川中島白桃	白鳳
DNA1	AB	BB	BB	AB	BC
DNA2	XX	XX	YY	XY	XX
DNA3	ST	TT	ST	TT	SS
DNA4	LL	LL	LM	LM	LM
DNA5					
DNA6					

照合した結果

果樹類での品種判別

農研機構 NARO

現在までに、DNA品種判別技術が確立している主要果樹と品種

樹種名	マーカー	判別可能な主要品種名
ナシ	ナシSSR	幸水、豊水、なつしずく、あきづきなど約100品種
リンゴ	リンゴSSR	ふじ、つがる、王林、千秋など約80品種
オウトウ	モモ+オウトウSSR	佐藤錦、高砂、紅秀峰など約100品種
スモモ	モモSSR	大石早生、ソルダム、太陽など約120品種
ウメ	モモSSR	南高、白加賀、豊後、小梅など約40品種
アンズ	モモ+アンズSSR	信州大実、ハーコットなど約
ビワ	ナシ+リンゴSSR	茂木、田中、長崎早生、楠、
クリ	クリSSR	ぽろたん、筑波、丹沢、銀寄など約30品種
カンキツ	CAPS，SSR	ウンシュウミカン、清見、はるみ、不知火など約40品種

モモ
セイヨウナシ
ブドウ
キウイフルーツ
でも研究レベルでは確立

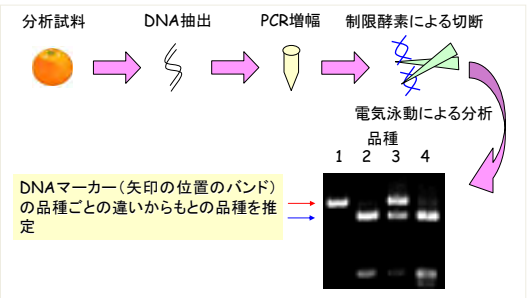
CAPS分析法

農研機構 NARO

CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) 法

CAPS法は、対象とする遺伝子領域をPCR法で増幅した後、制限酵素で特定の塩基配列を切断して長さの違いを検出する方法です。PCR-RFLP法とも呼ばれます。

塩基配列情報が必要ですが、比較的簡単な操作で正確な結果が得られます。



共優性マーカー、
PCR＋制限酵素処理で分析なのでシンプルな分析が可能、
ハイスループット分析には不向き

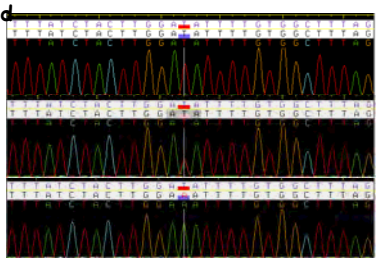
SNP markers

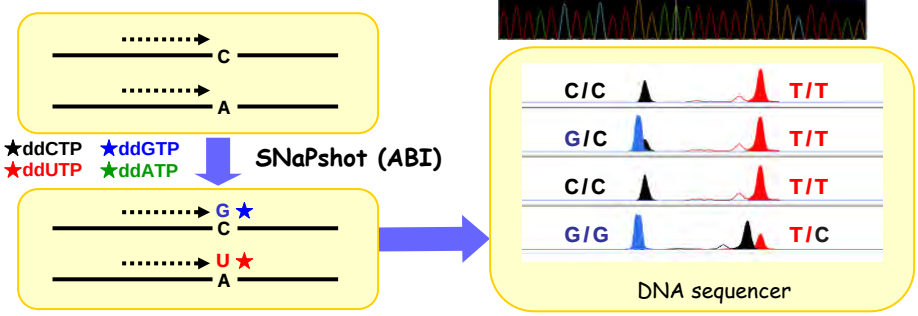
農研機構 NARO

- PIP (potential intron polymorphism) markers
  81 SNP markers established out of 288 tested

  (MdomPIP1-MdomPIP288,
  http://ibi.zju.edu.cn/pgl/pip/download.html)

- EST-derived SNPs
  24 SNP markers established out of 94 tested



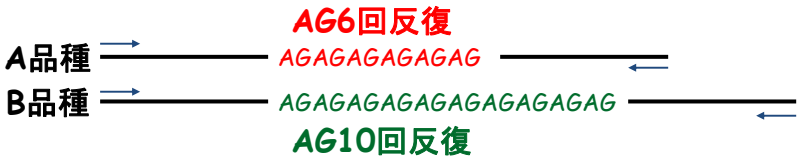


SSRマーカーとは？

農研機構 NARO

SSR=Simple Sequence Repeat（単純反復配列）

別名：マイクロサテライト、STR



★共優性マーカー
★信頼度高い
★多型性大
★汎用性あり
★豊富に存在

●バラ科果樹での標準マーカー
●DNAシーケンサーでの
自動分析可能

ただし、開発には多大な労力とコストがかかる
ブドウでは、多数のSSRマーカー情報が利用可能

SSRマーカー：BGT23b

農研機構 NARO

ーナシで濃縮法により約100種類のSSRを作成ー

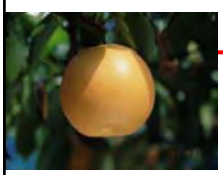
登録番号：AB219800、セイヨウナシ品種「バートレット」
至適アニーリング温度：55℃
プライマー1：CACATTCAAAGATTAAGAT
プライマー2*：gtttcttACTCAGCCTTTTTTTCCCAC (*gtttcttは波形を安定させるためのテイル配列)
反復モチーフ：(TC)18.5、ターゲットサイズ（bp）：203+8*

TTCACAGACACACGTAAAACTGTGTCATGT**CACATTCAAAGATTAAGAT**TCTCTCTCT
CTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTACAGCTACTTGTATAACTGCAAAATCTAGAG
GCCAGAGCTGCTGCTACAAATTTCCTTGACATTTTATTAATTGATTAGGTTTTGGTATTAT
ATATGCGTAAAGATTTATTCTTCTGCTAGATTTGG**GTGGGAAAAAAAAGGCTGAGT**CTA
GCATAAGACTCATAGATCTTCCAGGCTGAGAGTAGGAGGTGACCCATTGACCCAACTAGA
TTTTCAAATCCACTCATAGTAGAGGAAAATCCCTACATATACGAGGAAGAAAGTGAGTTAA
CGTGTATTAAAAGCCATTCTAATTCGATCACTACGATTCTCACATTCCCAGGGGCGTGTG
TGTGTGTGAAGAACCA

**赤太字は反復のモチーフ、青太字はプライマーを示す。

DNAシーケンサーによるSSR分析

農研機構 NARO

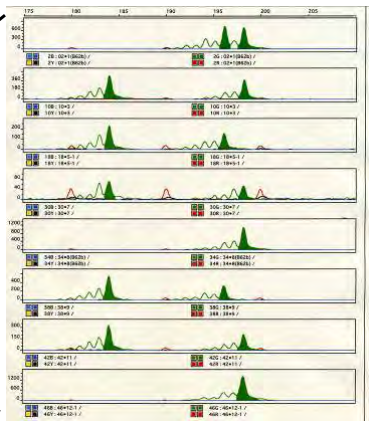


植物からDNAを取り出す

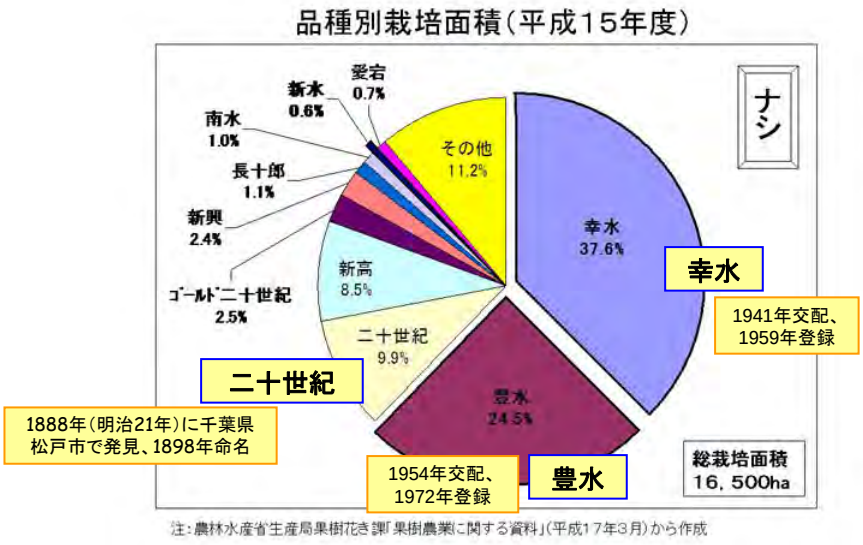
DNAの一部を増やす

DNA シーケンサーによる分析

解析結果



ナシの品種別栽培面積(H15年度)



SSRマーカーによるナシの品種判別

あきづき

あきあかり

秋麗

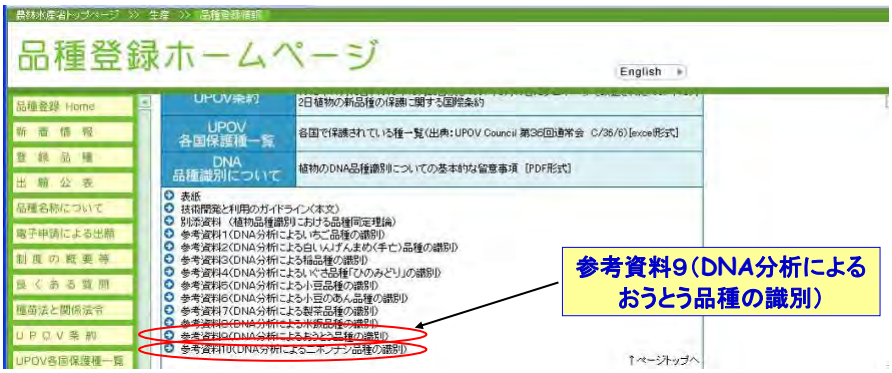
王秋

なつしずく

		BGT23b	BGA35	KA14	NH004a	NH005b
1	愛甘水	214/226	136/136	184/184	104/104	350/350
2	赤穂	196/226	128/136	184/184	104/112	330/350
3	あきあかり	196/226	136/136	184/184	81/118	330/350
4	秋高	196/206	136/136	184/184	104/118	330/350
5	あきづき	196/226	136/136	184/184	104/118	346/350
6	秋栄	196/196	136/136	184/184	81/104	350/350
7	あけみず	196/214	136/136	184/184	81/81	350/350
8	旭	196/214	136/136	184/184	81/104	330/350
9	愛宕	196/206	128/136	184/184	81/112	350/350
10	天の川	196/206	136/136	184/184	81/118	330/350

96品種×17マーカーのデータセット → 3回検証 → マニュアル完成

DNA分析によるニホンナシ品種の識別



参考資料10(DNA分析によるニホンナシ品種の識別)

- ●96品種(主要栽培品種、主要在来品種)
- ●17種類のSSRマーカー
- ●葉、果実、冬芽(葉芽、花芽)

http://www.hinsyu.maff.go.jp/

親子鑑定の原理

親から子供へ対立遺伝子の1つが必ず遺伝する

	母親		子供		父親
遺伝子座A	A1/A2	→	A1/A4	←	A3/A4
遺伝子座B	B1/B2	→	B2/B3	←	B3/B4
遺伝子座C	C1/C2	→	C1/C3	←	C3/C4
遺伝子座D	D1/D2	→	D2/D4	←	D3/D4
遺伝子座E	E1/E2	→	E1/E3	←	E3/E4

偶然一致する確率が0.2%以下になるまで
遺伝子座の数を増やして分析＝親子である

果樹の親子鑑定

農研機構 NARO

育成品種	M1a	M4c	M6a	M12a
白桃(親)	80 / 80	94 / 78	193 / 197	195 / 195
白鳳(子)	80 / 84	74 / 78	193 / 197	177 / 195
橘早生(親)	80 / 84	74 / 74	201 / 197	177 / 177

「白鳳」: 旧神奈川県農事試験場で育成。昭和8年命名。

17種類(4種類を上に示す)の
SSRマーカーで対立遺伝子の
1つを両親から受け継いでいる → 親子である

DNA鑑定による「豊水」の両親推定

農研機構 NARO

Sawamura Y. et al. (2004) Identification of parentage of Japanese pear 'Housui'. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 73: 511-518.

「豊水」育成と同時期の交配組合せ
(1953−1955)

↓

SSRマーカーによる調査
(DNAマーカーによる親子判別)
果皮色およびS遺伝子型の調査
(表現型等からみた親子の矛盾の有無)

↓

葉緑体DNAの配列の調査
(母親の推定)

85

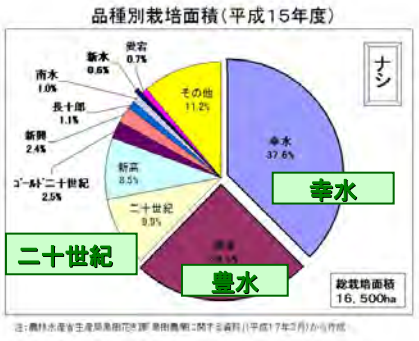
↓

2 — 幸水x イ−33
イ−33x 幸水

↓

1 — ♀ 幸水 x ♂ イ−33

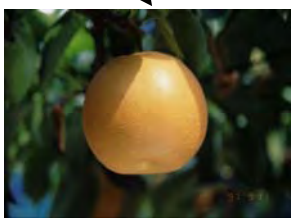
DNA鑑定結果による「豊水」の来歴

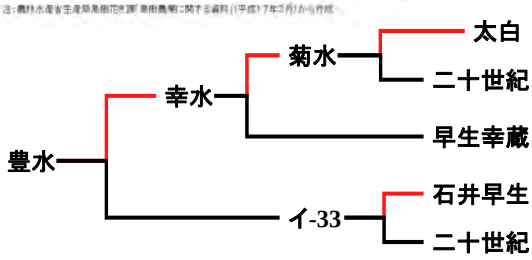


幸水(♀)　イ-33(♂)

×

豊水





クリ柱の遺物

三内丸山遺跡
（青森県青森市）

縄文時代前期～中期
（約5,500年前～4,000年前）

出土した種子・縄文ポシェット

農研機構 NARO

クリのDNA品種識別

農研機構 NARO

渋皮が簡単にむける画期的なニホングリ品種「ぽろたん」

登録番号第15658号
登録年月日2007年 10月 22日

チュウゴクグリ	「ぽろたん」	ニホングリ
・果実：小さい	果実：大きい	・果実：大きい
・渋皮：むけやすい	渋皮：むけやすい	・渋皮：むけにくい

チュウゴクグリ「岐阜1号」	ニホングリ新品種「ぽろたん」	ニホングリ「筑波」

DNA品種識別技術の開発と育成者権の保護が必要

SSRマーカーによるクリの分析

農研機構 NARO

ニホングリ由来SSRマーカー **25→7**

ヨーロッパグリ由来SSRマーカー **46→5**

71種類からDNA鑑定に適した
SSRマーカー**12種類**を選抜

	SSR marker	k	H_O	H_E
ニホングリ由来SSR	KT001b	12	0.894	0.873
	KT004a	21	0.848	0.841
	KT005a	18	0.818	0.819
	KT015a	11	0.439	0.590
	KT020a	7	0.788	0.727
	KT029a	11	0.803	0.803
	KT030a	11	0.758	0.803
ヨーロッパグリ由来SSR	CsCAT18	5	0.712	0.657
	CsCAT24	6	0.455	0.581
	EMCs2	4	0.727	0.665
	EMCs13	3	0.424	0.462
	EMCs14	4	0.500	0.633
	Average	9.4	0.681	0.705

・k:対立遺伝子数

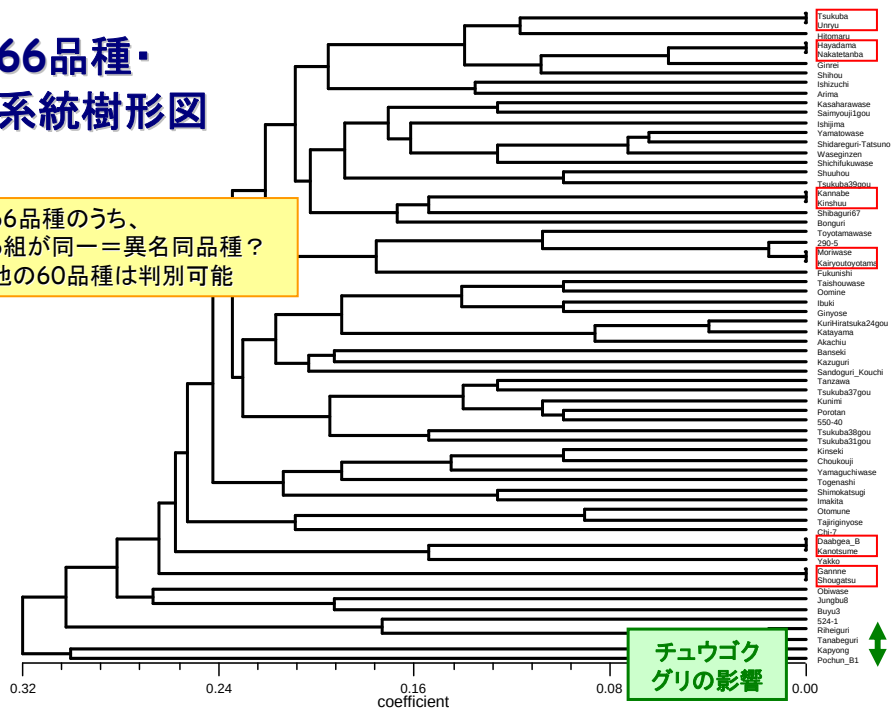
・HO:ヘテロ接合度観察値

・HE:ヘテロ接合度理論値

・Cervus ver2.0

66品種・系統樹形図

66品種のうち、
6組が同一＝異名同品種？
他の60品種は判別可能

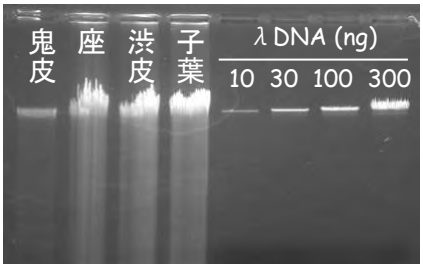


Genomic-tip法によるDNA抽出

農研機構 NARO

供試材料 :「ぽろたん」(種子親)に「筑波」(花粉親)を交配して得られた果実

鬼皮、座、渋皮、子葉の各組織400 mg
↓
ビーズ式細胞破砕装置 で破砕
↓
Genomic-tip (Qiagen社) を用いて抽出



鬼皮、座、渋皮は種子親由来の組織

子葉は次世代組織(種子親＋花粉親)

鬼皮、座、渋皮および子葉からDNAを効率良く抽出することが可能

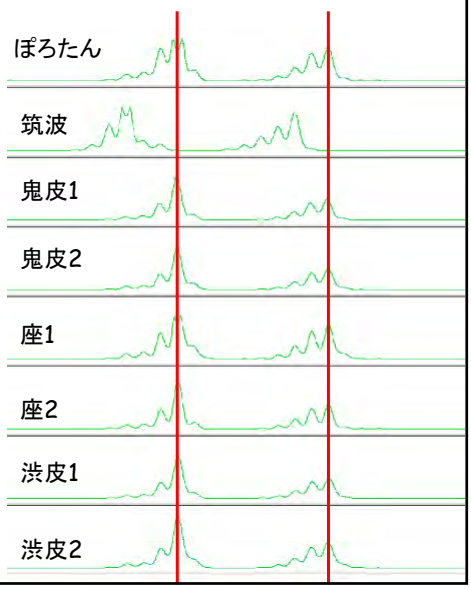
鬼皮、座、渋皮から抽出したDNAの分析

農研機構 NARO

供試材料
「ぽろたん」(種子親)×「筑波」(花粉親)
鬼皮、座、渋皮から抽出したDNA

供試SSRマーカー
・ニホングリ由来　7種類
・ヨーロッパグリ由来　5種類

鬼皮、座、渋皮から抽出したDNAは、種子親である「ぽろたん」と同じ遺伝子型を示した



子葉から抽出したDNAの分析

農研機構 NARO

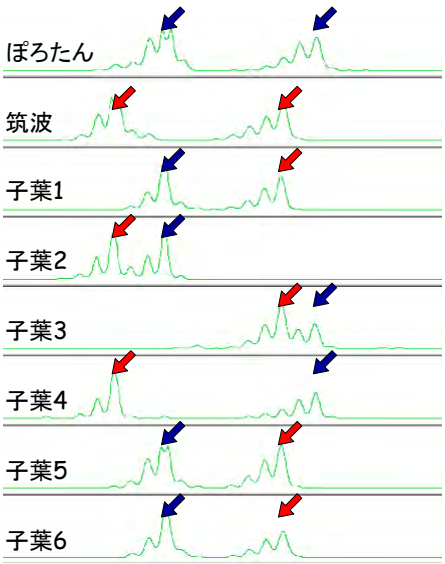
供試材料
「ぽろたん」(種子親)×「筑波」(花粉親)
子葉から抽出したDNA

供試SSRマーカー
・ニホングリ由来　7種類
・ヨーロッパグリ由来　5種類

子葉から抽出したDNAは、種子親「ぽろたん」＋花粉親「筑波」由来の対立遺伝子の増幅が認められた

→ 多くのSSRマーカーが必要

→ 親子鑑定を考慮した品種識別ソフトウェア開発



クリ加工品のDNA鑑定

農研機構 NARO

・「ぽろたん」は、国産クリ生産・消費拡大の起爆剤として期待されている
・クリは、和洋菓子や料理での利用＝果実加工品での利用が多い
・クリは、中山間地域の重要な換金作物

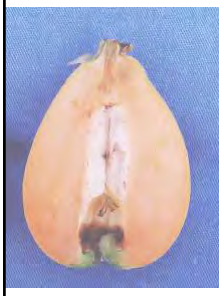
＊栗御飯、栗きんとん、栗まんじゅう、モンブラン
栗最中、栗納豆、焼き栗、マロンパイ、栗ぜんざい等

現在、数十種類のクリ加工品を収集中・分析中

ビワのDNA品種識別

農研機構 NARO

世界に先駆けた種子なしビワ品種「希房」のDNA鑑定

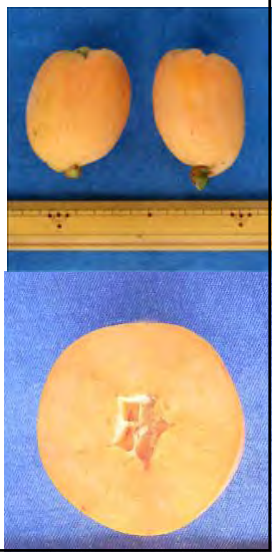


登録品種の名称：希房（キボウ）

登録番号：第13767号

登録年月日：2006年 2月 27日

この品種は、「田中」実生の4倍体に「長崎早生」を交配して育成されたものであり、肥大処理した果実の縦断面が長卵、大きさが大、果皮色が橙黄のハウス栽培向きの**3倍体品種**である。、、、、、、、、、**種子数が極少**であること等で区別性が認められる。



「世界に先駆けた種子なしビワ品種「3N-N28」の産地定着技術の確立」

先端技術を活用した農林水産研究高度化事業（H16-18）

ナシとリンゴ由来SSRのビワへの適用

農研機構 NARO

ビワと同じバラ科ナシ亜科に属する ナシとリンゴ由来SSRマーカーの適用

	ナシ由来SSR	リンゴ由来SSR	Total
供試したマーカー数	43	45	88 (100%)
ビワで増幅したマーカー数	28	24	52 (59%)
ビワに利用可能かつ品種間で多型マーカー数	14	13	27 (31%)

希房および両親のSSR遺伝子型（抜粋）

SSRマーカー	SSR遺伝子型* 希房	4N田中実生-1(♀)	長崎早生(♂)
CH03g06	178/178/180	178/178/178/178	176/180
CH04h03	94/102/102	102/102/102/102	94/94
CH05a04	185/185/187	185/185/185/185	185/187
NH007b	129/141/147	129/129/147/147	129/141
NH014a	164/182/188	164/164/182/182	135/188
NB114a	133/137/137	137/137/137/137	133/133

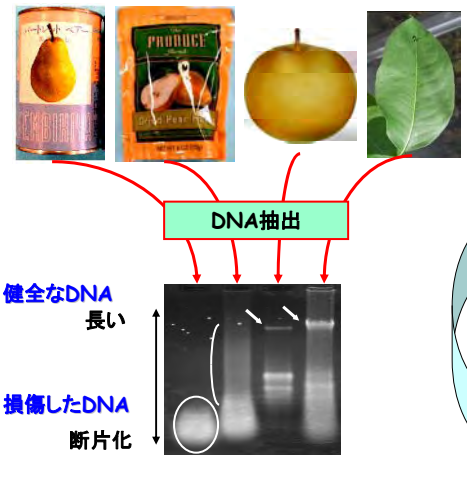
*対立遺伝子をPCR増幅産物の長さ（bp）で表す
希房：三倍体
4N田中実生-1：四倍体（コルヒチンで倍化）
長崎早生：二倍体

**希房には、
4N田中実生-1から2対立遺伝子が、
長崎早生から1対立遺伝子が、
遺伝している**

Watanabe M. et al. (2008) J. Japan. Soc. Hort. Sci. 77: 388-394.

販売されている様々な果実加工品

果実・加工品でもDNA鑑定が可能



材料	DNA鑑定
生果実	◎
乾燥果実	◎
缶詰果実	△*
ジュース	△*

*一部のサンプルでDNA鑑定可

損傷したDNAであっても、DNAが単離できれば、DNA鑑定が可能

缶詰、シロップ浸けのDNA分析

缶詰やシロップ浸けから、DNAを取り出すことが可能でした

取り出したDNAはひどく損傷していましたが、DNA分析が可能でした

150bp以下のSSRで分析可能

SSR マーカー	バートレット (葉)	缶詰サンプル
NH014a	70/72	70/72
NH004a	90/96	90/96
NB103a	103/127	103/127
NH015a	107/119	107/119
NH001c	122/158	122/158
KA16	133/135	133/135
NH007b	138/140	138/140
NH009b	143/149	+
NH011b	168/172	-----
KA14	179/187	-----
BGT23b	206/236	-----
NH005b	328/328	-----

リンゴチップスのDNA分析

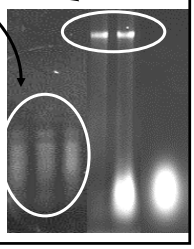
農研機構 NARO

低温フライ加工

フリーズドライ

●リンゴチップスから、DNAを取り出すことが可能でした

●製造方法の違いにより、取り出したDNAの損傷程度が異なっていましたが、DNA分析が可能でした



ジュース・果実酒

農研機構 NARO

ジュースから、DNAを取り出すことが可能でした

取り出したDNAはひどく損傷していましたが、DNA分析が可能でした

材料に偽りはありませんでした

果実酒から、DNAを取り出すことができませんでした

現在、DNAを取り出す方法について、検討しています

品種判別・産地判別に向けての新しい展開
−DNAタグ（DNAマーキング）−

農研機構 NARO

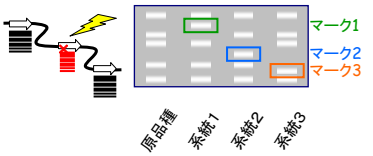
1：重イオンビーム照射

「ダメージコントロール」による
外見上識別できない系統の選抜

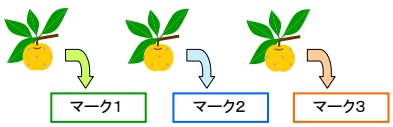
原品種　系統1　系統2　系統3

2：「反復配列トラップ」によるDNA変異探索

非遺伝子領域である反復配列の変異をPCRで検出



3：品種識別・産地判別 DNAマークの作成



系統1
A県 あるいは
種苗生産業者A
へ配布

系統2
B県 あるいは
種苗生産業者B
へ配布

系統3
C県 あるいは
種苗生産業者C
へ配布

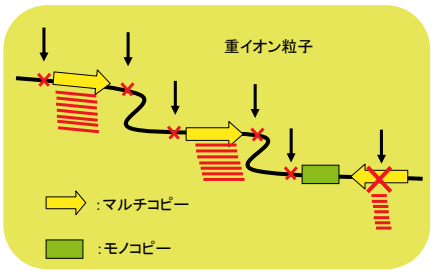
「マーク」による品種の識別を行い、各産地や種苗生産業者に配布することで、優良品種の産地判別が実現

新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業
「DNAマーキングによる栄養繁殖作物の
品種・産地判別技術の開発」で実施中

反復配列トラップとは？

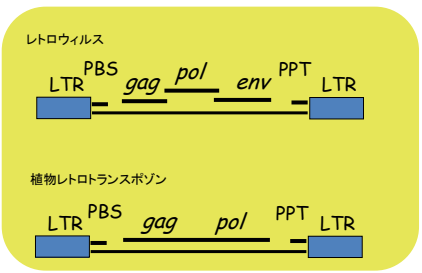
農研機構 NARO 理研中央研

「反復配列トラップ」



●特定領域を予め決めて、入った変異をPCR増幅により検出する
　→「トラップ」
●特定領域として反復配列に注目
　→非遺伝子領域で多コピー存在すること
　→欠失しても表現型に影響はない、
　　あるいは、少ない。

「レトロトランスポゾントラップ」



●ゲノム中に多コピー存在する。
●ウィルスから高等生物に至るまで塩基配列の高い保存性がある。
→ゲノム情報の少ない作物でも
　　プライマー作成に利用できる
→手法としての汎用性

ナシのDNAマーク開発

農研機構 NARO 果樹研究所

●SSRによる既存品種の識別に多大な実績

（果樹研究所果樹ゲノム研究チーム）

●あきづき：平成13年品種登録

今後の普及が大いに期待される品種

●重イオンビーム照射を行った約100個体（穂木照射、芽数で数百個）を高接ぎ・ 切り接ぎにより保存・維持

（果樹研究所内）

先取的なDNAマーク開発の必要性

・あきづきのDNAマーク開発

２．種苗法と品種保護に関する最近の情勢

種苗管理センター品種保護対策課・課長

田平雅人

平成21年度革新的農業技術習得支援事業
DNA品種判別技術
平成21年10月19日
農研機構果樹研究所

種苗法と品種保護に関する最近の情勢

品種保護Gメン
独立行政法人種苗管理センター

Ⅰ　品種登録制度の概要

Ⅱ　権利侵害への対応

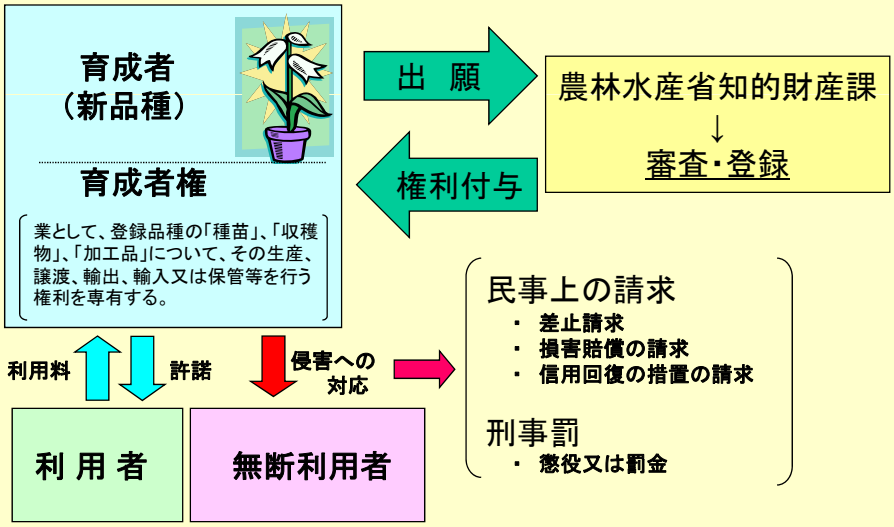
Ⅲ　侵害事例の紹介

Ⅳ　登録品種の標本・ＤＮＡ保存事業

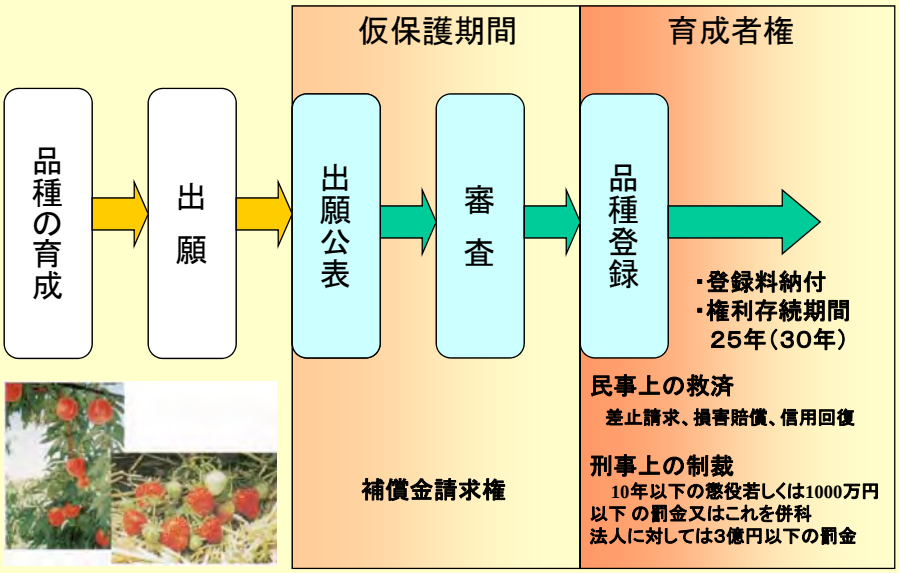
Ⅰ　品種登録制度の概要

植物新品種の保護制度の概要

－種苗法による品種登録と育成者権の付与・保護－



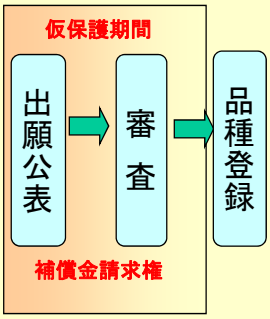
品種登録手続きの流れ



出　願　公　表

時　期	出願の受理後遅滞なく（補正が命じられた場合は適切な補正後）
方　法	官報告示 （印刷物、インターネット）
公　表 事　項	・出願公表の年月日 ・出願品種の属する農林水産植物の種類 ・出願品種の名称 ・出願者の氏名又は名称 ・出願者の住所又は居所 ・品種登録出願の番号及び年月日

仮　保　護



仮保護期間	出願公表から品種登録までの間
仮保護の内容	出願者は、品種登録後、審査期間中に自己の出願品種の種苗等の生産・譲渡等をした者に対して利用料相当額の補償金の請求が可能。 ただし、請求ができるのは原則として事前に書面による警告等を行った場合

区別性（Distinctness）

公然知られた他の品種と重要な形質に係る特性の全部又は一部によって明確に区別されること

出　願　品　種

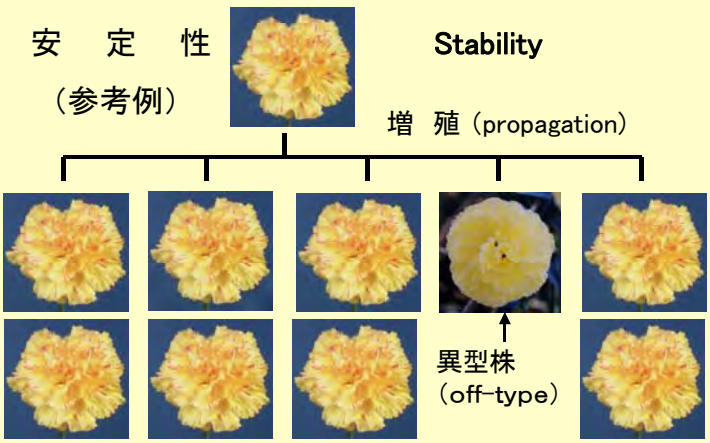
対　照　品　種

均一性（Uniformity）

同一の繁殖の段階に属する植物体のすべてが特性の全部において十分に類似していること

安定性　Stability

繰り返し繁殖させた後においても特性の全部が変化しないこと。



品 種 登 録 の 要 件

区別性	既存品種と重要な形質（形状、色、耐病性等）で明確に区別できること
均一性	同一世代でその形質が十分に類似していること
安定性	増殖後も形質が安定していること
未譲渡性	出願日から1年遡った日より前に出願品種の種苗や収穫物を譲渡していないこと 外国での譲渡は、日本での出願日から4年（永年性植物は6年）遡った日
名称の適切性	品種の名称が既存の品種や登録商標と紛らわしいものでないこと

育 成 者 権 と は ？

◆ 育成者権：植物の新品種を育成した者について、「種苗法」に基づく品種登録により発生する権利。

◆ 育成者権の存続期間は**登録日から25年**（果樹、茶等の**永年性植物は30年**）ただし、登録料を支払う必要がある。

◆「育成者権」を有する権利者は、**業として、登録品種等の「種苗」、「収穫物」及び政令で定める「加工品」**について、その生産、譲渡、輸出、輸入又は保管等を行う権利を**専有**。

育成者権の効力が及ばない範囲

◆ 新品種の育成その他の試験又は研究のための品種の利用

◆ 権利者等の意志に基づいて譲渡された場合（権利の消尽）

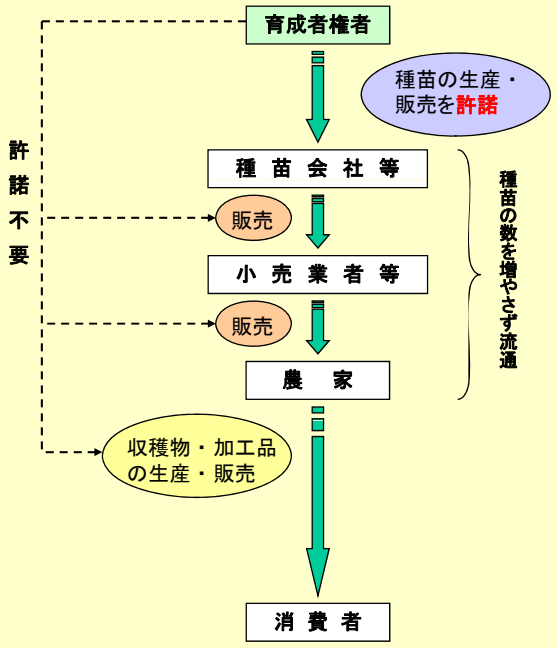
〔例外〕
- 種苗の増殖をする場合
- 当該植物が品種保護の対象となっていない国へ輸出する場合

◆ 農業者の自家増殖の場合

〔例外〕
- 農林水産省令で定められた82の種類の植物については、育成者権の効力が及ぶ（許諾が必要）。
- 契約で自家増殖の制限がされている場合には、契約に従って育成者権の効力が及ぶ（許諾が必要）。

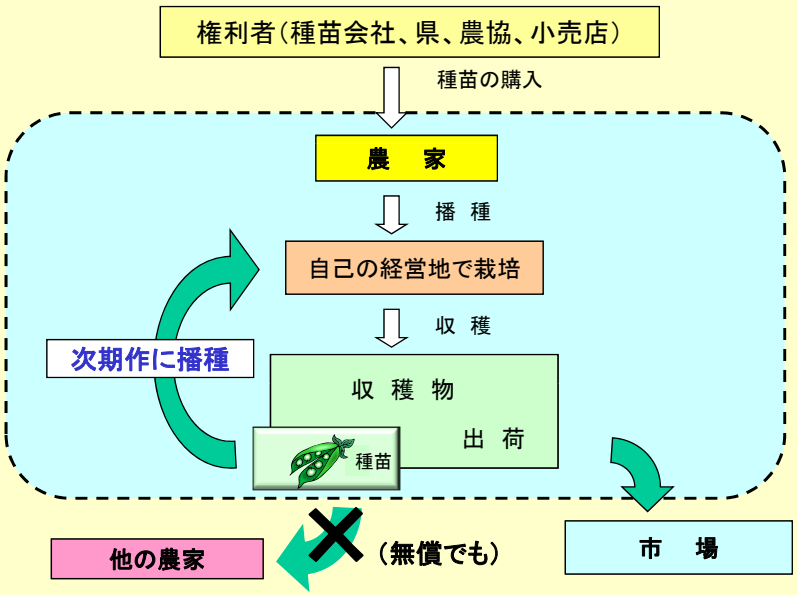
権利の消尽とは・・・

育成者権の効力が及ばない範囲



育成者権の効力が及ばない範囲

農業者の自家増殖とは？



省令で定める82種類の植物（平成20年10月現在）

野菜(4種類)：おもだか属、ししうど属（とうきを除く）、スマランサス属、せいようわさび属

果樹(3種類)：パパイヤ属、まつぶさ属、マルピーギア属

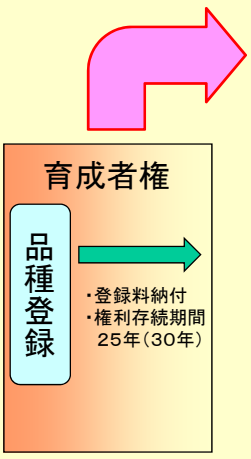
草花(53種類)：アルストロメリア属、オドントグロッサム属、オンシジウム属、かすみそう属、カトレア属、ガーベラ属、カランコエ属、クレマチス属、ジゴカクタス属、シンビジウム属、セントポーリア属、チューリップ属、デンドロビウム属、なでしこ属、ペチュニア属、ペラルゴニウム属、ほうせんか属、かきつばた種、カーネーション種、アガスタケ属、アンゲロニア属、イソトマ属、いわだれそう属、ヴァーレンベルギア属、エオニウム属、エクサクム属、エボルブルス属、エリンギウム属、おりづるらん属、カリシア属、グラプトペタルム属、スカエウオラ属、スコパリア属、セネキオ属（シネラリア属を除く）、ソリダゴ属、ソリダステル属、たつなみそう属、ちぢみざさ属、ディアスキア属、ディーフェンバキア属、ディサ属、とけいそう属、ノラナ属、はえとりぐさ属、ビデンス属、プラティア属、プレクトランツス属、ヘレボルス属、まるばびゆ属、まんねんぐさ属、ローマかみつれ属、らっきょうときいいとらっきょうとの交雑種、らっきょうとやまらっきょうとの交雑種

鑑賞樹(19種類)：あじさい属、ばら属、ポインセンチア種、アデニウム属、えごのき属、エルウァタミア属、きだちるりそう属、げっけいじゅ属、シンフォリカルポス属、セルリア属、たばこそう属、つた属、デイコ属、ディジゴテカ属、ドゥランタ属、パキラ属、ひさかき属、ルクリア属、ゆすらうめ種

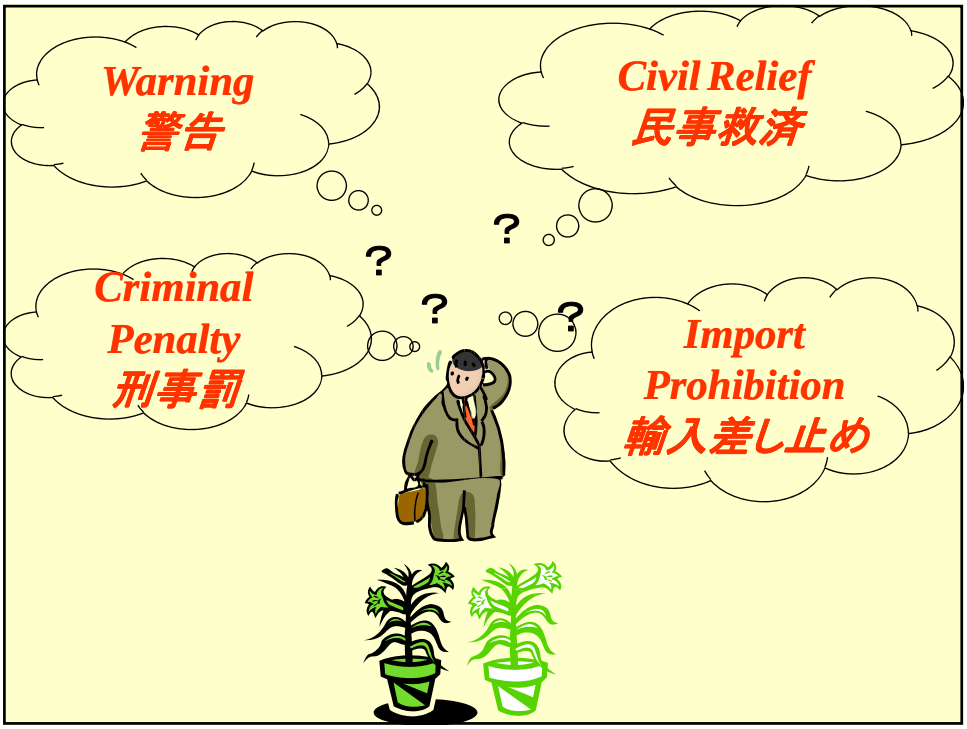
きのこ(3種類)：しいたけ種、はなびらたけ種、ほんしめじ種

Ⅱ　権利侵害への対応

権利侵害への対応



民事上の救済	差止請求	育成者権者等は自己の権利を侵害する者又は侵害するおそれがある者に対し、その侵害の停止又は予防を請求することができる
	損害賠償の請求	育成者権者等は自己の権利を侵害した者に対してその侵害により自己が受けた損害の賠償を請求することができる
	信用回復の措置の請求	育成者権を侵害したことにより育成者権者等の業務上の信用を害した者に対しては、裁判所は請求により業務上の信用を回復するのに必要な措置を命ずることができる
刑事上の救済	罰則	育成者権又は専用利用権を侵害した者は、10年以下の懲役若しくは1,000万円以下の罰金に処し、又はこれを併科する。 法人の場合、3億円以下の罰金刑

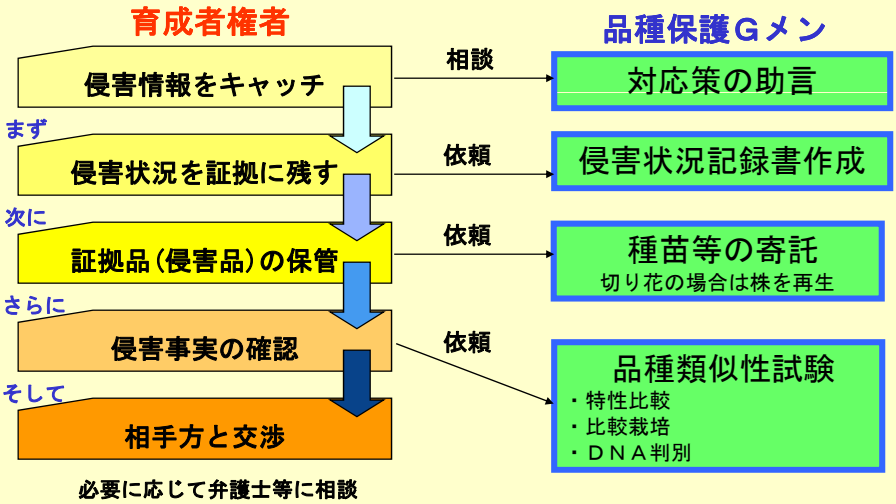


品種保護Gメンの設置

本所（茨城県つくば市）と
西日本農場（岡山県笠岡市）に計４名

平成17年4月1日

登録品種が侵害にあった場合の対応



相談窓口の開設

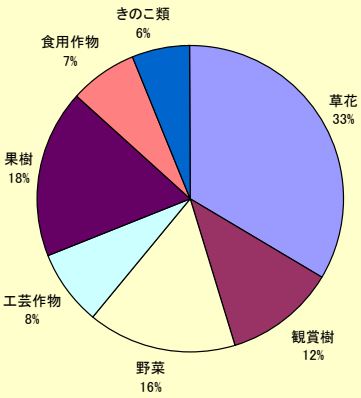
TEL 029-838-6589

FAX 029-838-6583

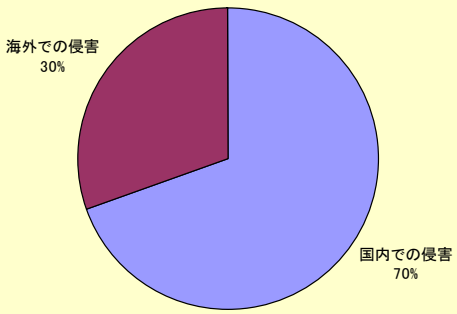
Email hinsyu_gmen@ncss.go.jp

平成17年度以降の侵害相談の内訳（132件）

＜侵害を受けた植物＞



＜侵害を受けた場所＞



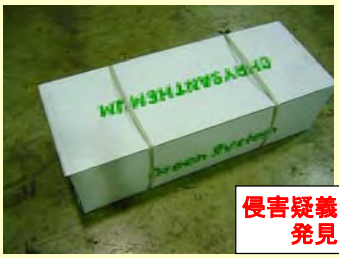
平成17年4月1日～平成21年3月31日現在

侵害状況記録書の作成

市場でのサンプリング

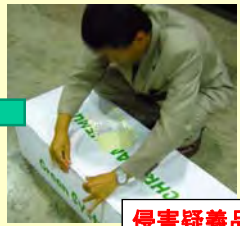
手数料：¥11, 550 ＋ 品種保護Ｇメンの旅費

侵害状況記録の作成と寄託



侵害疑義品の発見

侵害疑義品の確認

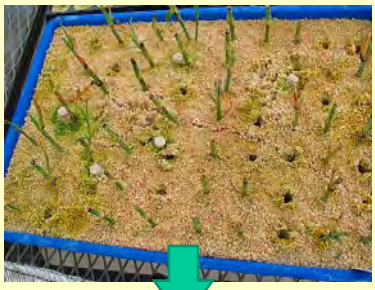


侵害疑義品の封印

依頼者が特性調査を行う農場に送付

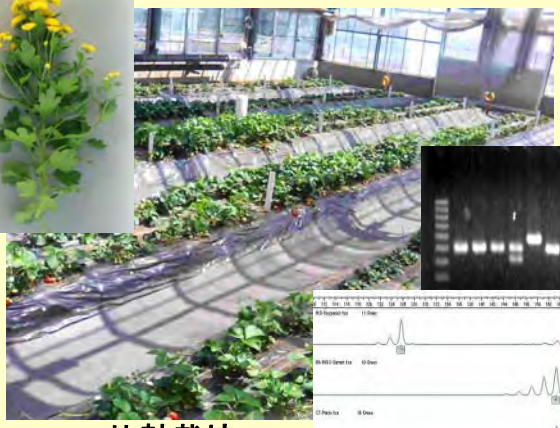
寄託

切花からの植物体の再生

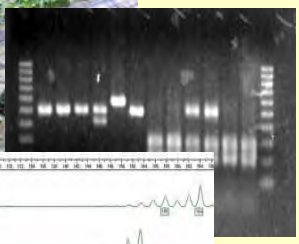


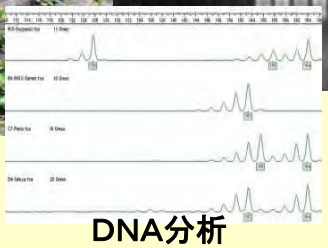
品種類似性試験

特性比較
¥22,050



比較栽培
¥126,000





DNA分析
¥33,390

相談、品種類似性試験、侵害状況記録及び寄託

	H15-16年度	H17年度	H18年度	H19年度	H20年度
相談件数	13	36	31	33	32
品種類似性試験（品種数）	2	16	22	4	5
侵害状況記録件数			3	3	12
寄託（品種数）			8	10	10

Ⅲ　侵害事例の紹介

事例（豪州人を育成者権侵害で刑事告訴）

・おうとう「紅秀峰」（登録番号2893号　山形県育成）

穂木1本

日本 → オーストラリア

オーストラリア ⇢ 日本

サクランボ

雑誌記事（グルメジャーナル2005年6月号）

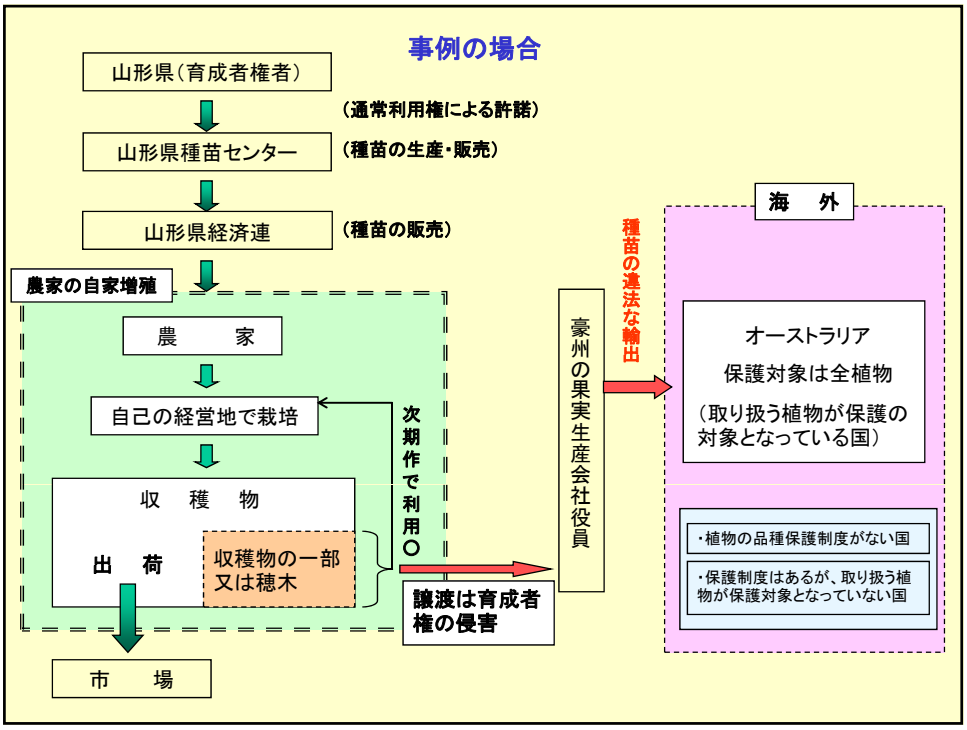
Ａ（山形県の農家）は、１９９９年にＢ（豪州の果実生産販売会社役員）に紅秀峰の穂木１本を譲渡し、Ｂはその穂木を国外に持ち出した。

Ｂはその穂木から果樹園を作り、生産したサクランボを日本に輸出しようとしている。

事例

「紅秀峰」の育成者権者である山形県は、事実確認のために農家の事情聴取を行った。品種保護Ｇメンはこれに立ち会い、陳述内容を確認した。（2005年7月）

山形県は、違法に登録品種の種苗を輸出したとして、オーストラリアの果物生産会社役員2人を告訴した。（2005年11月）



輸入差止申立て

山形県は育成者権侵害の恐れがあるとして「紅秀峰」の輸入差止申立てを税関に行った。（2005年12月）

種苗管理センターは輸入差止申立てに係る認定手続きに際して、DNA分析による品種識別で税関を支援した。

和解成立

山形県（甲）と果実の生産販売業を営むオーストラリア人経営者（乙）で和解成立。（2007年7月）

・乙は違法行為を認め、反省の意を表明する。

・乙は紅秀峰の品種登録期間終了後3年間は当該品種の種苗及び収穫物を日本に輸出しない。

・甲は告訴を取り下げる。

この事例から学べること。

1　地域限定戦略は、契約で守る。

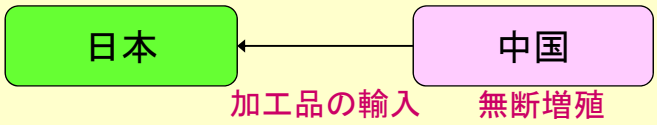
2　属地主義。費用対効果

3　他の法令にも精通しておく。

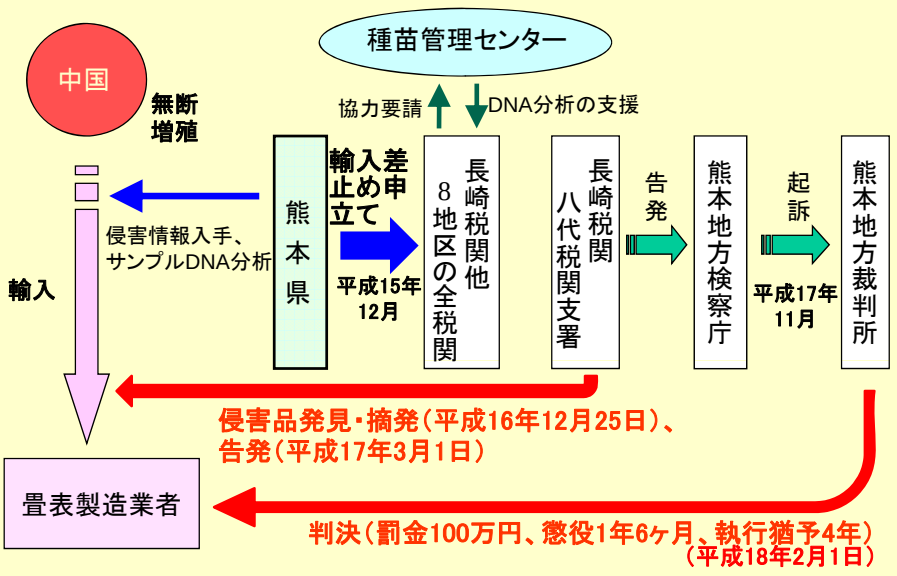
4　DNA品種識別技術は不可欠。

事　例

・いぐさ「ひのみどり」
（登録番号第9034号　熊本県育成）



事例　いぐさ「ひのみどり」侵害対応の流れ



農林水産省知的財産課

プレスリリース

2009年7月10日

いぐさ「ひのみどり」の輸入は違法行為です！！

現在、日本で育成された品種である「ひのみどり」との疑いがあるいぐさが中国の一部の地域で栽培されているとの情報があり、日本への輸入が懸念されます。
「ひのみどり」は種苗法に基づく登録品種であり、原草はもちろん、「ひのみどり」を使用した畳表やゴザなど、その加工品を輸入した場合は、法律違反となりますのでご注意ください。

1.「ひのみどり」の日本への輸入は育成者権(※)の侵害となります。

中国では、いぐさは品種保護制度の対象植物となっていないため、日本で品種登録されている「ひのみどり」の苗を中国に持ち出すためには、その育成者権者である熊本県の許諾が必要となりますが、熊本県はその許諾を行っていません。
したがって、中国から日本に輸入されたいぐさが「ひのみどり」と判明した場合は、種苗法に基づく育成者権の侵害に該当します。育成者権を侵害した者は、種苗法による法的措置として、刑事罰(10年以下の懲役又は/併科1000万円以下の罰金(法人の場合は3億円以下の罰金))を科せられる場合があります。
なお、いぐさの育成者権は、いぐさの原草や畳表だけでなく、その加工品であるゴザにも及びます。

2.「ひのみどり」の輸入は、税関での水際取締りの対象となります。

関税法により、育成者権侵害品は「輸入してはならない貨物」となっており、これを輸入した者は、同法により、7年以下の懲役又は/併科700万円以下の罰金を科せられる場合があります。

※育成者権とは・・・
種苗法に基づき、新しい品種を育成した者に与えられる 独占的な利用権をいい、その権利を有する者を育成者権者といいます。

いぐさ「ひのみどり」の特徴

・茎が細い
・着花(花瘡)が非常に少ない
・変色茎の発生がほとんどない
※DNA鑑定による原草や加工品(畳表やゴザ)の品種識別技術も確立しています。

ご不明な点がございましたらー　農林水産省生産局知的財産課　tel:03-6744-2118

この事例の教訓

1．侵害品を確認できる手法を確立することの重要性。

2．関税法による差し止めは有効な対抗手段。
DNA品種識別技術を確立。

その他の育成者権侵害事例（事実関係は新聞報道等による）

植物名	品種名（権利者）	概　　要
いんげんまめ	雪手亡（北海道）	中国に種苗が無断で持ち出され、その収穫物が我が国に輸入、販売されていた。北海道からの警告により、輸入業者は中国からの高級白あん原料用いんげん豆の輸入を自粛。
小豆	きたのおとめ、しゅまり（北海道）	中国に種苗が無断で持ち出され、その収穫物が我が国に輸入されていた。北海道からの警告により、輸入業者は中国からの日本品種の小豆の輸入を自粛。
いちご	レッドパール（個人育種家）	韓国の一部の者に生産・販売を許諾したが、韓国内で種苗が無断で持ち出されその収穫物が我が国に輸入、販売されていた。育成者権者が輸入業者を相手に裁判を起こし、輸入を取りやめることなどを条件に和解。なお、韓国国内における無断栽培は継続中。
	章姫（個人育種家）	韓国の一部の者に生産・販売を許諾したが、韓国内で1990年代半ばから種苗が無断増殖されており、現在も無断栽培が継続中。
	とちおとめ（栃木県）	韓国に種苗が無断で持ち出され、その収穫物が我が国に輸入、販売されていた。栃木県が許諾先の業者に文書で注意。
エリンギ	ホクト1号（きのこ生産会社）	原告会社は、自社のエリンギの品種登録につき、被告が違法に販売したとして提訴。これに対し、長野地裁は、平成18年5月19日、同品種は先に韓国で登録されていた品種と同一であるとして、原告の育成者権を無効と判断、原告の損害賠償請求を棄却（知財高裁も控訴棄却、最高裁も不受理）。

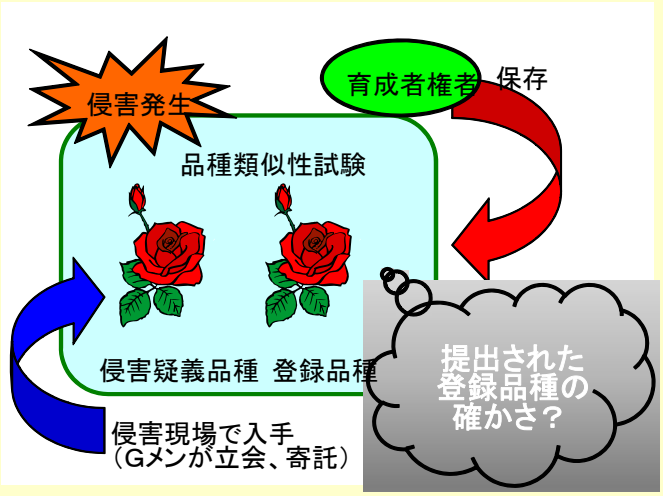
Ⅲ　登録品種の標本・DNA保存事業

登録品種の標本・DNA保存等委託事業のうち
登録品種の標本・DNA保存事業

平成20年度
平成21年度

委託先：
（独）種苗管理センター

事業の目的
〇権利行使のために利用できるDNAを保存する。
〇登録品種の権利範囲を確定するために利用する。
〇新たなDNA品種識別技術の開発に利用する。



保存方法

○　長期保存が必要　少なくとも50年。

保存方法	メリット	デメリット
①抽出DNAの凍結保存	すぐに利用可能	長期保存不可
②凍結乾燥葉標本	長期保存可能	ー
③さく葉標本	現物確認可能	保存場所が必要

採集方法

○　オリジナル性の証明が必要

①　登録に際して栽培試験を経由する品種

センターの栽培試験ほ場から品種保護Gメンが採集し日付・写真等を記録。DNA、凍結乾燥、さく葉標本として保存。データベース化。

②　登録に際して現地調査、資料調査を経由する品種

農水省審査官の調査後、品種登録通知後、出願者が試料をセンターに送付し、保存。DNA，凍結乾燥標本として保存。データベース化。

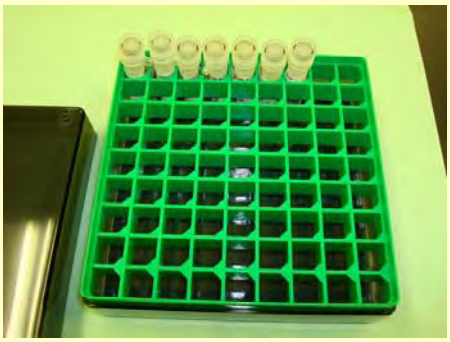
③　権利者の同意を得て保存する

権利者から「資料保存依頼書」を提出してもらい、登録品種のオリジナルDNAが保存されていることを認識してもらう。

登録品種の標本・DNAの採集手順

凍結乾燥葉保存とデータ管理

抽出DNAの保存方法



さく葉標本の保存

登録品種のDNA保存の実績

2009/6/26現在

保存品種数	内　訳	
	出願品種	既存品種
895 点	715 点	180 点
内数		
カーネーション類	117 点	5 点
イチゴ	85 点	3 点
キク	81 点	3 点
バラ	74 点	12 点
果樹類	31 点	106 点

ご静聴ありがとうございました。

独立行政法人種苗管理センター

品種保護Gメン

５．DNAマーカーによる早期選抜と品種判別技術

果樹ゲノム研究チーム・上席研究員

清水徳朗

平成21年度 革新的農業技術研修
研修課題名 ・ DNA品種判別
カンキツの交雑実生早期選抜と品種判別技術

果樹研究所
カンキツ研究興津拠点

果樹ゲノム研究チーム
上席研究員・清水 徳朗

果樹におけるゲノム研究の背景と目的

農研機構 NARO

果樹研究所のミッション

- 農業の競争力強化と健全な発展に関する研究
- 次世代の農業を先導する革新的生産技術の研究開発
- 食の安全・消費者の信頼確保と健全な食生活の実現

研究での取り組み

- 高品質化を達成する技術開発
- 迅速で低コストな新品種開発
- 先端的知見を活用した農業生物の開発およびその利用技術の開発
- 育成品種の権利保護

ゲノム研究の取り組み

- ゲノム情報の解析とデータベース化
- ゲノム研究ツールの開発と利用
- DNAマーカー開発 遺伝連鎖地図作成
- 選抜マーカー開発
- 重要形質の分子機構解明

果樹研究所におけるカンキツの交雑育種過程

播種・育苗（2～3年）
年間25組合せ×200粒=5,000個体

高接ぎ
（1,000個体/年）

利用可能な圃場面積は限定されている
年間高接ぎ本数が育種規模の制限要因

環状剥皮等による開花促進
（4～5年）

予備選抜 (1～2年)
2次選抜 (2～5年)

高接ぎ前に有望個体を選抜
できれば、接ぎ木個体あたり
有望品種の出現確率を増大
することができる

系統適応性検討試験(3～5年)
0～1品種 / 11～20年

カンキツ育種へのDNAマーカー利用の期待

カンキツ育種の現状と問題点

現状

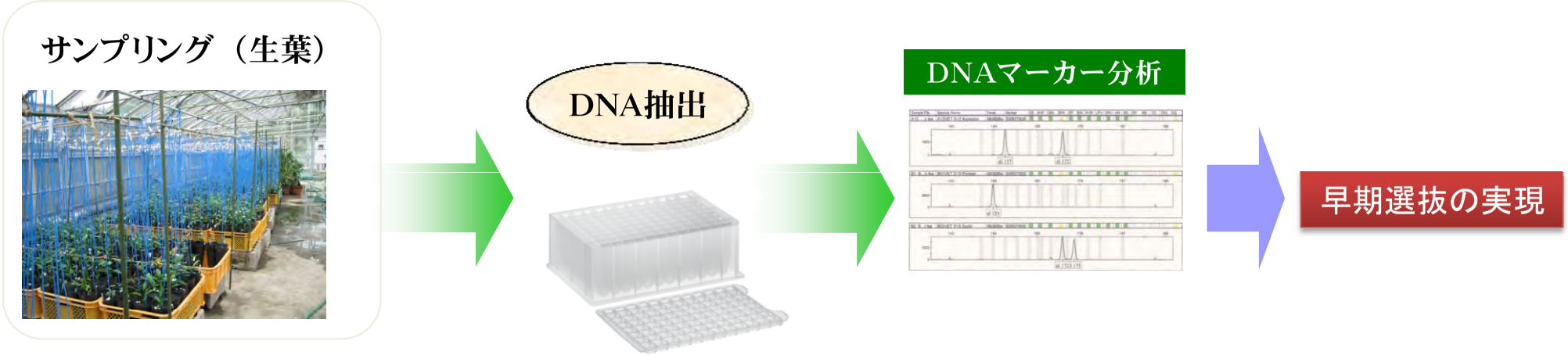
- 数千の実生個体から開始して最終的に品種として登録されるのは1個体程度
- 播種後開花に至るまで平均7年間を要する

問題点

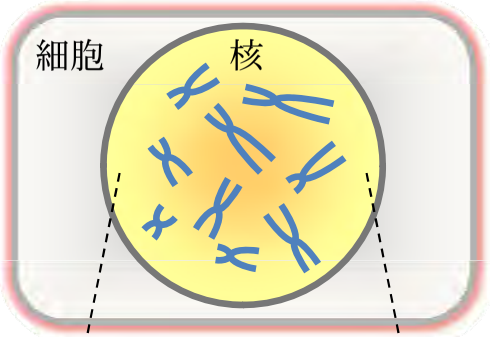
- 開花に至るまでの期間、および、開花後果実などの特性を調査する間、多数の個体を長期間圃場で維持、管理する必要がある
- 重要形質の評価には高いレベルの試験が必要で多大な労力を必要とする
- 一度に複数の形質を取り込ませた品種育成は困難

DNAマーカー利用の特徴と効果

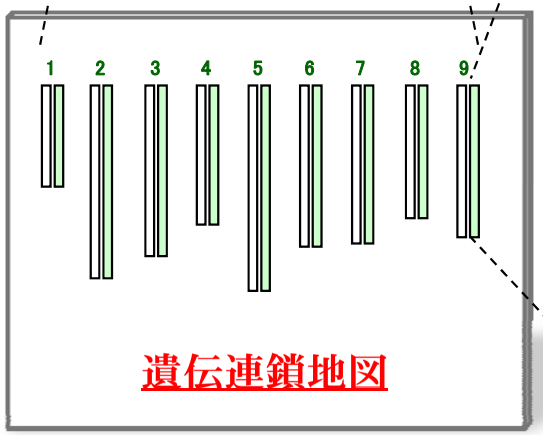
- 目的とする形質と密接に関わるDNAの特徴を利用し、DNAの特徴から形質を予測する方法をDNAマーカー分析と呼び、そのような目的に使用されるDNAを「DNAマーカー」と呼ぶ
- 形質を評価するかわりにDNAを分析することにより、形質を予測することが可能となる
- 果実形質の場合、結実を待たずに目的の形質を有する個体を早期に選抜することで、圃場での維持、管理に要する労力とコストを削減することが出来る
- 複数の形質に関わるDNAマーカーを利用して複合形質を一度に選抜することで、育種を効率化することができる



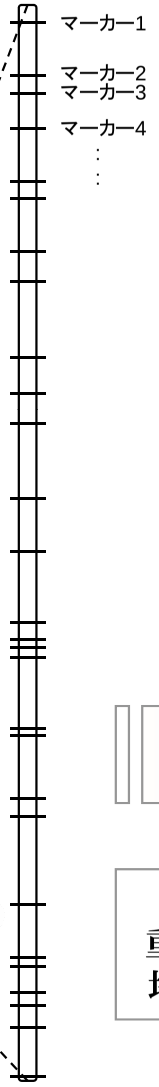
DNAマーカーを利用した早期判別の原理



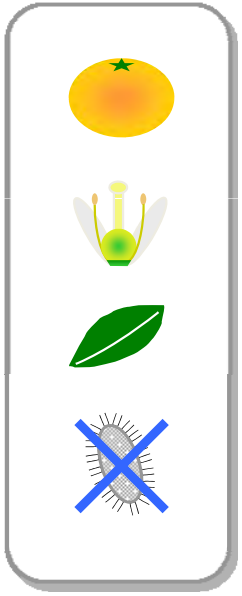
DNAマーカー（染色体上の目印）を利用して遺伝連鎖地図を作成する



遺伝連鎖地図



連鎖群
DNAマーカーで表現した染色体の仮想構造



形質マッピング
重要形質の位置を連鎖地図と対応づけて表示

DNAマーカーによる早期選抜

目的形質に最も近いDNAマーカーを選択

最も近いDNAマーカーを調べることで、目的形質の有無を推定することができる

○単一遺伝子に支配される形質であれば少数のマーカーの評価で解析が可能

×複数の遺伝子に支配される形質では複数のマーカーが必要だが数が増えるとマーカー作成自体が困難になるという問題もある

DNAマーカーの利用：育種での早期選抜

幼苗を育成

接木により増殖

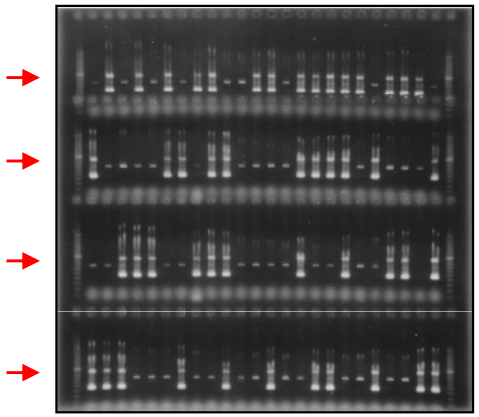
数年かけて育成し、特性評価

従来育種…

圃場の利用効率向上

DNAマーカーを利用した早期選抜育種

DNAマーカーを利用して
幼苗段階で選抜する



選抜した個体だけを育成

事前に選抜した個体から
優良なものをさらに選抜

種なし性、CTV抵抗性に利用可能なかんきつのDNAマーカー

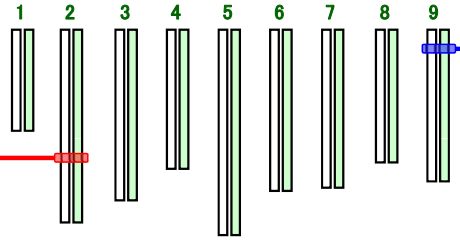
農研機構 NARO

CTV抵抗性の遺伝子座

感染樹

健全樹

カンキツ遺伝子地図



完全無核性の遺伝子座

種なし　種あり

DNAマーカーを利用して幼苗段階でCTV抵抗性の個体を選抜する

DNAマーカーを利用して幼苗段階で種なし性の個体を選抜する

DNAマーカーを利用したCTV抵抗性カンキツ中間母本

カンキツ中間母本農7号

カンキツ中間母本農8号

交配

DNAマーカーを利用した種なし性のカンキツの品種、中間母本

カンキツ中間母本農5号

カンキツ中間母本農6号

サザンイエロー

＊CTV：カンキツトリステザウイルス

複数の育種素材とDNAマーカーを組み合わせる複合選抜により、種なしでCTV抵抗性の個体を短期間で選抜することが可能になり、育種効率が飛躍的に向上する。

カンキツの品種構成の特徴と問題点

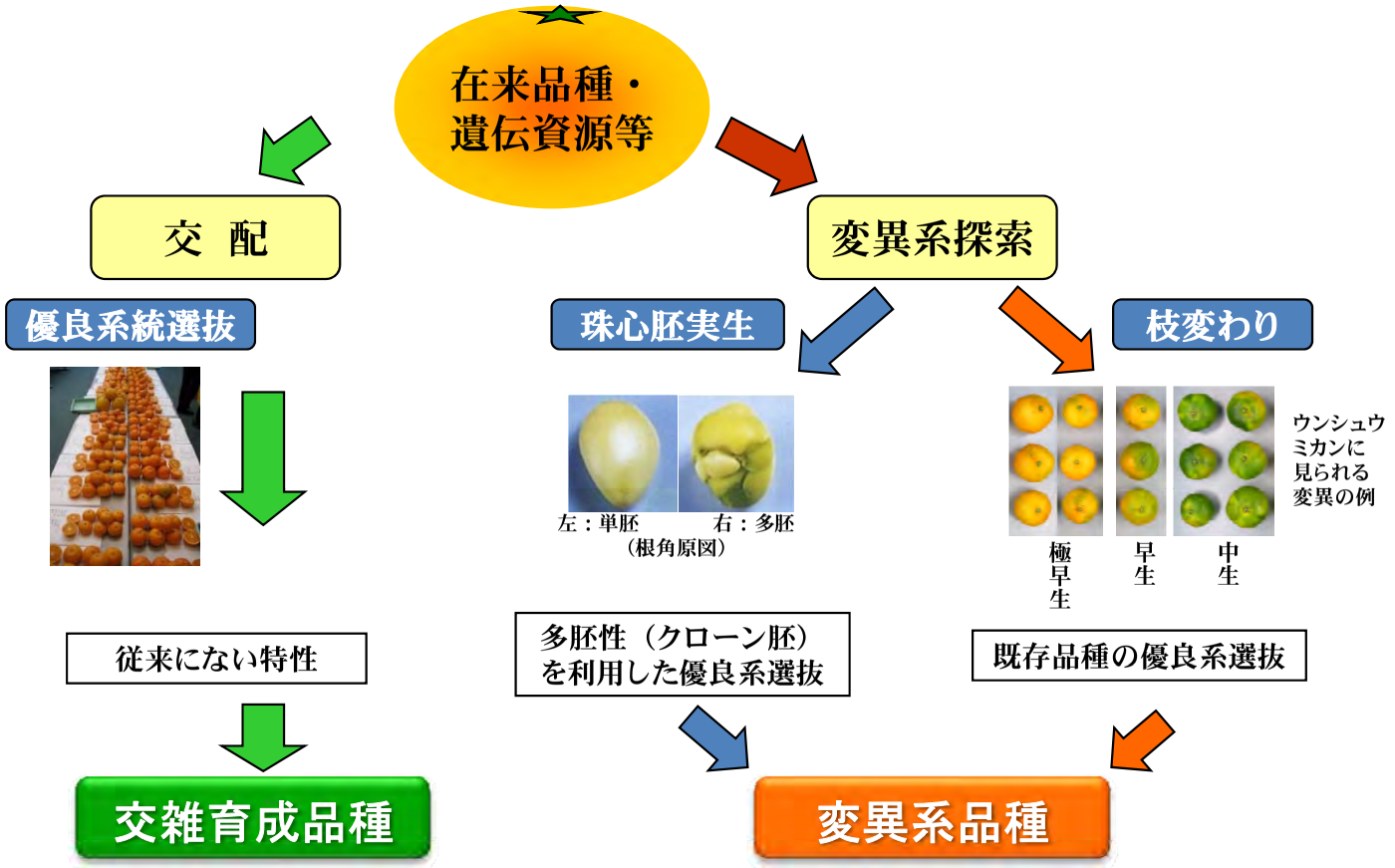
カンキツの「品種」には

- ■在来系（遺伝資源）
- ■交雑育成品種
- ■変異系品種

が存在し、対象とするものにより利用可能な多型の頻度は大きく異なる

交雑育成品種間での多型頻度は一般に高く、DNAマーカーを利用した品種判別が可能

一方でウンシュウミカンやオレンジなど重要な経済品種に属する変異系由来の品種間では、多型を利用した品種判別は極めて困難である



新規性	大	小
育種コスト	大	中～小
育種期間	長い（12～20年）	短い（1～7年）
多型頻度	**多**	**極微**
代表的な品種	清見、デコポン、はるみ、たまみ、はれひめなど近年育成された品種	ウンシュウミカン、ポンカン、スィートオレンジ、レモン、グレープフルーツなどの重要な経済品種群

カンキツの育成品種

農研機構 NARO

果樹研究所育成品種

興津早生
三保早生
久能温州
瀬戸温州
興春ポンカン
はるみ
清見
朱見
スイートスプリング
サマーフレッシュ
メイポメロ
イエローポメロ
サザンレッド
サザンイエロー
ホワイトラブ
はやさき
南香
清峰
早香
津之香
紅まどか
ありあけ
天草
はれやか
ミホコール
陽香
あまか
不知火
西之香
せとか
ぷちまる
はれひめ
麗紅
たまみ
べにばえ
ミニマートル1号
カンキツ口之津41号
西南のひかり
津之輝

計 39 点

公立研究機関育成品種

大分1号
吉田ポンカン
垂水1号
岬の香
大橘
S1128
サガマンダリン
ビューティメイプル
駿河紅温州
富士見温州
阿波オレンジ
紀の国温州
豊の宝柑
愛媛中生
キヨマー
清の香
薩州
大島1号
かごしま早生
紀秋早生
湘南ゴールド
徳島3x1号
愛媛果試第16号
愛媛果試第10号
肥の豊
せとみ
愛媛果試第14号
肥のさやか
肥のあすか
肥のあかり
愛媛果試第28号
広島果研7号
名護紅早生

計 33 点

市町村・民間等育成品種

豊のミドリ
大谷伊予柑
力武早生
大浦早生
阿波オレンジ
盛田温州
尾鈴早生
石塚早生
徳森早生
井上早生
湘南ゴールド
楠本早生
宮本早生
堂脇早生
金沢早生
森田ポンカン
古田温州
清岡橙
佐々木温州
足立ネーブル
農間紅八朔
山見阪ネーブル
山下紅早生
サマーレッド
小堀新甘夏
太田ポンカン
市文早生
祖母の香
高林早生
イセ温州
寿太郎温州
河井
白浜1号
上野早生
香美の川
稲葉早生
室戸小夏
山川早生
ニュー上市温州
森早生
真求力温州
勝山伊予柑
白鳥日向
紀州葵
宝韶寿
善九郎
日南1号
紀宝早生
秀山早生
ニュー則村
岡本早生
新和ジューシー
絹平
宿毛小夏
原温州
小原紅早生
平の香
伊都早生
扇温州
春峰
芝原サワー
実八早生
ゆら早生
田口早生
西内小夏
久賀早生
はるか
新姫
太幸早生
築地原早生
佐藤の香
石地
おおたけ
松岡小夏
師恩の恵
日浦早生
こん太
平勝早生
川原
曽根早生
串
いさお早生
エクリーク15
寒立林平
まりひめ

計 85 点

計 157 点

カンキツの多胚性と交雑実生早期選抜

多胚性の育種への利用と問題点

左：単胚　　右：多胚
（根角原図）

カンキツの多胚性とは?

交雑種子の生育とともに珠心由来の
の組織が無性胚として発生する現象

アポミクシスの一種であり、珠心由来の胚（珠心胚）は親と同じクローンとなる

主要カンキツ品種の平均胚数

品種名	胚数
リスボンレモン	2.38
マイヤーレモン	1.10
平戸ブンタン	1.00
ワシントンネーブルオレンジ	16.80
バレンシアオレンジ	17.92
ユズ	4.90
ウンシュウミカン	20.78
ダンカングレープフルーツ	14.94
清見	1.00
ポンカン	49.46

※上野ら（1967）を一部改変

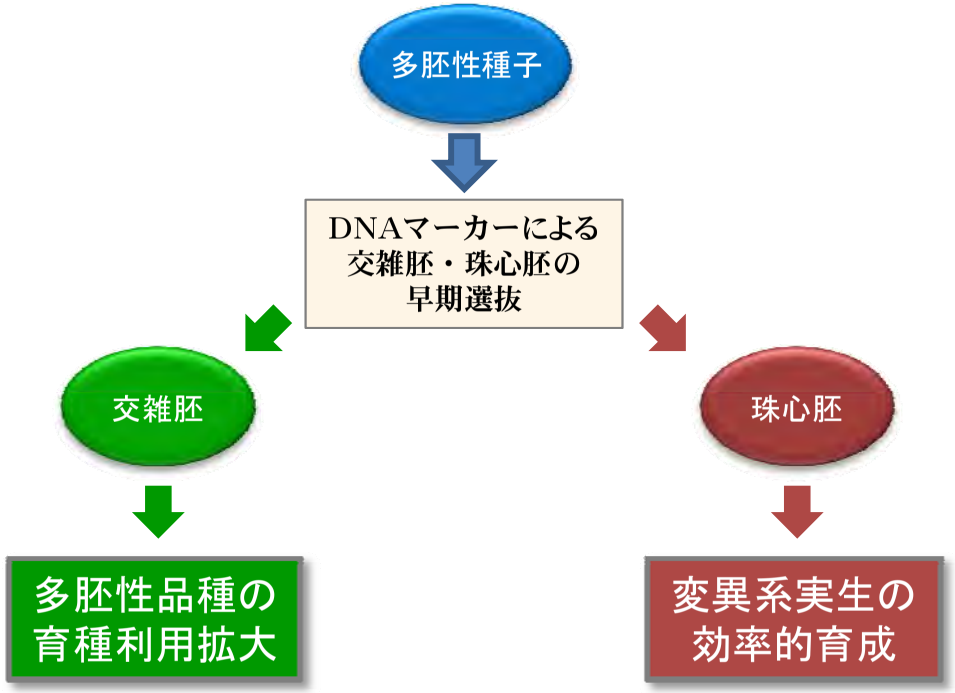
多胚性の利用と問題点

利用場面

- クローン種子を利用した大量増殖が可能
- 種子からの再増殖によりウィルスフリー化、樹勢回復が可能
- 一部の形質が変化した珠心胚実生を発見することで、形質の大幅な変化を避けて特定の形質のみを改良することができる

問題点

- 珠心胚は一般に交雑胚よりも強勢のため交雑種子の獲得が困難で交雑育種の障害となる
- 珠心胚実生由来の変異系品種はその元となった品種と遺伝的にほぼ同一で多型の検出は困難である



DNAマーカー分析の実際

農研機構 NARO

DNAマーカー分析のための各段階

DNAマーカーの開発

- 特定の品種、系統間で多型（遺伝的変異）を示すDNA断片を検索する
- 見出した多型を分析が容易なDNAマーカーに変換する

DNAマーカーの評価

- 目的形質が分離した交雑実生集団を育成する
- 実生集団中における目的形質の遺伝様式を明らかにする
- 開発したDNAマーカーのうち、目的形質と強く相関するものを同定する

DNAマーカー分析の実施

- 対象とする集団、個体からDNAを抽出する
- DNAマーカーの分析結果から形質を予測する
- 可能な範囲で形質とDNAマーカー分析結果の一致を確認する

必要となる材料・技術・情報

利用可能な品種、遺伝資源等

基本的な実験機器

各種遺伝子、DNA情報の集積

分類・同定済みの基準品種

目的にあった分析機器

各品種ごとのDNAマーカー情報データベース

DNAマーカー分析を前提とする材料の養成

多検体の効率的なDNA抽出・分析技術

分析マニュアル

DNAマーカーによる品種判別の背景と目的

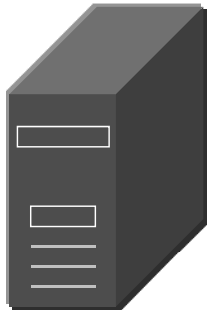
農研機構 NARO

サンプリング（生葉や果実等）

DNA抽出

DNAマーカー分析

マーカー情報の照合



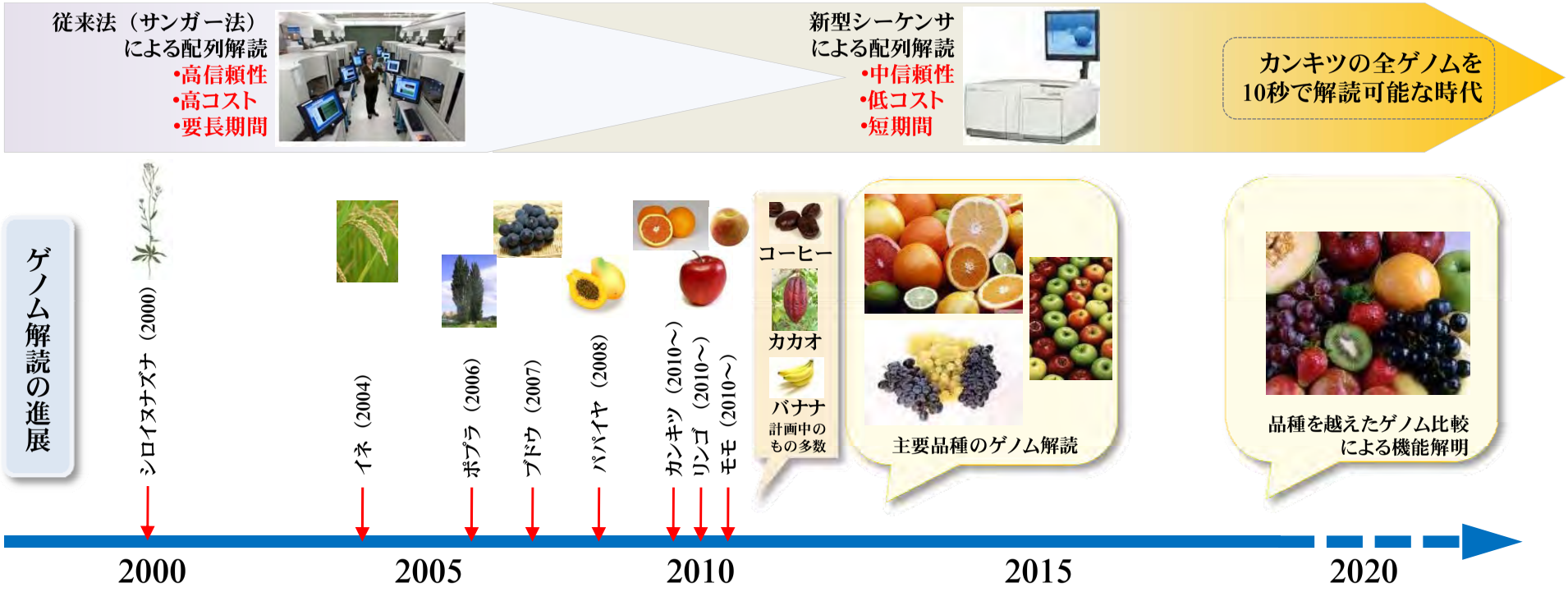
品種・マーカー情報
データベース

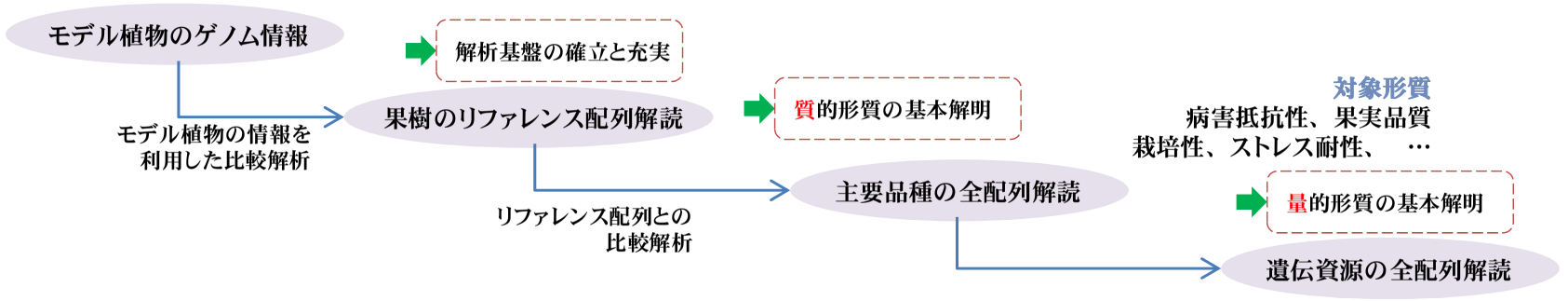
背景：平成17年度種苗法改正により、育成者権侵害に対する罰則が引き上げられ、加工品にも権利が及ぶことになった。

目的：外観などに頼らず、加工程度の進んだ製品でも科学的な品種判別技術を提供することで、育成者権を適切に保護する。

果樹のゲノム研究の現状と今後

2007年の新型シーケンサ実用化以降　ゲノムの解読速度が飛躍的に向上し続けている





必要な計算量が指数関数的に増大

ゲノム関連用語集

あ行 遺伝子、 遺伝子産物	それぞれの生物を特徴付ける遺伝情報のうち、一つの生物学的特徴を指令する情報を遺伝子と称する。遺伝子は酸性物質であるデオキシリボ核酸（DNA）中にアデニン（A）、シトシン（C）、グアニン（G）、チミン（T）という4種類の塩基成分が鎖状に結合した構造を有する。遺伝子はDNA中のA、C、G、Tのいずれかの配列で特定されるアミノ酸の配列を納めており、その情報を元に作られるアミノ酸の配列から特有の機能を持ったタンパクが作られる。 各遺伝子の情報に従い合成されるタンパクを、遺伝子産物と称する。
遺伝子座	ある特定の遺伝子の染色体上での位置。遺伝連鎖解析を利用することで染色体上での相対的な位置を推定することが可能となる。
遺伝連鎖地図	染色体上で、耐病性や果実品質などの遺伝的な形質や特定のDNA配列などがどのような順序で並んでいるかを2次元の地図として示したもの。 地図上の個々の情報はマーカーと呼ばれる。
EST	Expressed Sequence Tag（発現配列タグ）の略。メッセンジャーRNAの相補的（complementary）DNA（cDNA）の部分塩基配列のこと。cDNAは細胞内で発現された遺伝子の塩基配列を表し、ESTは遺伝子の塩基配列に到達する手段のひとつと考えられている。
さ行 染色体	真核細胞の核内に存在する構造体で、そのなかに遺伝子が保有されている。 この構造体はDNAと種々のタンパク質から構成され、顕微鏡下で染色することによりその形を観察することができる。 染色体の数は生物種によって決まっており、カンキツでは9組の相同染色体からなる合計18本の染色体をもつ。

cDNA	相補的DNA。mRNA（メッセンジャーRNA）を鋳型に試験管内で合成されたDNA。 cDNAはタンパク質に翻訳される情報をもったmRNAと相補的な塩基配列を持つことから、それらの塩基配列を明らかにすることにより各配列がどのようなタンパク質（アミノ酸配列）の合成を担っているのかが解析できる。
早期選抜マーカー	ある特定の形質を、その形質を個別に検証することなく、DNA分析のみで判定することが可能なDNAマーカーのこと。果実形質では結実はで10年程度待つ必要があり、その間圃場で長期間材料を維持しなければならない。DNAマーカーを使用することで播種後数ヶ月で分析することが可能となり、材料維持のめの労力とコストを大幅に低減することが出来る。
た行 耐病性	特定の病気に対して抵抗性を示す性質。 耐病性は遺伝子に支配される形質であり、耐病性遺伝子を有する品種と有さない品種を交配することで、耐病性の遺伝子を組み込んだ個体を育成することができる。
DNA多型	遺伝子や遺伝子以外のDNA配列が個体間や品種間で異なりをもっていること。たとえばある遺伝子が多くの個体についてそれぞれ違った配列を持っていると「多型性が高い。」という表現を使う。品種識別に用いる部分は、品種内では多型性が無く（一定の配列）、品種間では多型性（異なった配列）をもつものでなければならない。
DNAマーカー	遺伝連鎖地図上の特定の位置と対応付けることが可能な、特定のDNA断片のこと。生物学的なマーカー（遺伝マーカー）と区別する目的でDNAマーカーと呼称される。 近年の分子生物学的手法の進歩により、生物的な特性に関わりなく、信頼性の高いDNAマーカーを効率よく作成することが可能となった。特定の形質と密接に連鎖するDNAマーカーを用いることで、育種を大幅に効率化することが可能となる。

は行	
PCR法	ポリメーラーゼ連鎖反応（Polymerase Chain Reactions）法の略。DNAポリメラーゼと呼ばれる、もとのDNA鎖を利用して新しいDNA鎖を合成する酵素（ポリメラーゼ）を利用し、DNAを繰り返し複製させる方法。DNA中にある複製したい塩基配列の始めと終わりの部分と相補的な短いDNA断片（プライマー）を作り、もとのDNAと結合させ、その部分をスタートとしてDNAポリメラーゼにより目的の領域をコピーさせる。
プライマー	ヌクレオチドの複製を行う際必要な、複製開始点となる相補的ヌクレオチド断片。PCR反応ごとに個別のプライマーを組み合わせることで、任意のDNA領域を選択的に増幅するために使用する。
ベクター	特定のDNAの断片を大腸菌や酵母、動植物などの細胞中で、細胞分裂の過程においても安定的に維持することが可能なDNA断片。通常、抗生物質の抵抗性遺伝子が組み込まれており、このベクターが導入された細胞が抗生物質に抵抗性となる性質を利用して、ベクターが導入された細胞のみを選択することが可能となる。
マイクロサテライト	短い数塩基の配列の繰り返し構造のこと。 品種間で高頻度に多型を示すことから、DNAマーカーとしてよく利用される。SSR、STRとも呼ばれる。

６．DNAマーカー計算ソフトウェア

果樹ゲノム研究チーム・主任研究員

藤井　浩

1　DNA マーカー計算ソフトウエアの目的

育成者権の保護と不正表示の防止を目的に，多数の農作物で品種判別を目的とした DNA マーカーの開発が行われ，生鮮農産物の品種判別だけではなく，加工食品の原材料品種の判別に関する研究も進められている。ところが，DNA マーカー数や適用した品種数が増え，一覧表に記載されるデータ量が多くなると，統計計算やその前処理としての書式変換を表計算ソフトウエアのマニュアル操作で行うことが困難になってきた。そこで，果樹研究所では，さまざまな品種に DNA マーカーを適用してその結果を一覧表にした DNA マーカー型一覧表の解析のために必要な 9 種類の計算処理を簡単な操作で自動的に実現するソフトウエア MarkerToolKit を開発した。

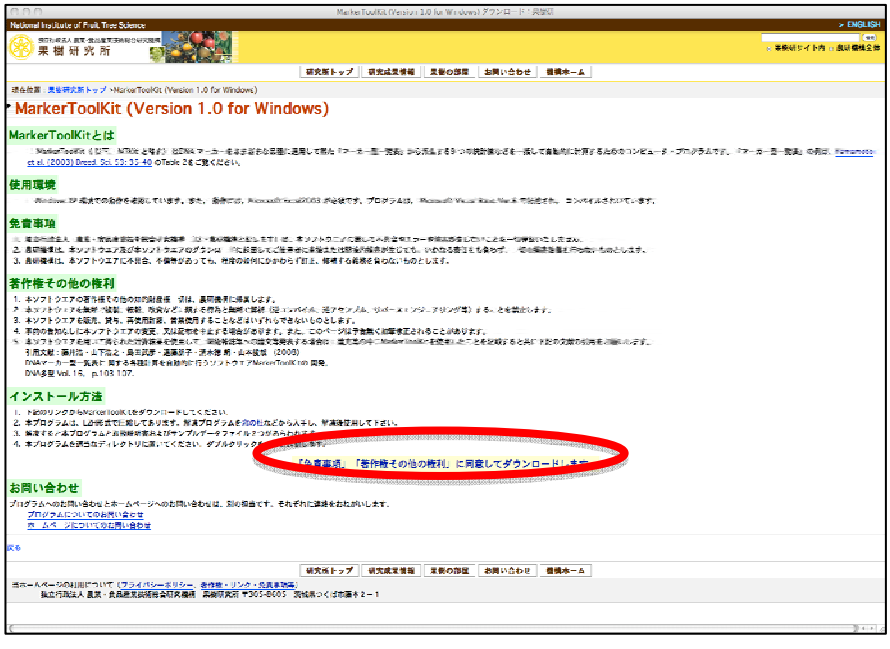
また，加工食品には，多くの場合，複数の原材料品種が使用されている。このため，加工食品に DNA マーカーを適用した場合，複数品種由来のマーカー型が合成されて現れる。したがって，加工食品の原材料品種の判定を行うには，加工食品の DNA マーカー型と事前に調べておいた原材料品種ごとの DNA マーカー型とを比較して，加工食品に含まれていても矛盾のない DNA マーカー型を持つ原材料品種を論理的に推定するという作業が必要になる。しかし，DNA マーカー数や原材料品種数，調査する加工食品数が多いと，比較作業に時間がかかる。そこで，加工食品と原材料品種の DNA マーカー型のデータから，加工食品に含まれる原材料品種を簡単な操作で迅速に判定するソフトウエア MixAssort を開発した。

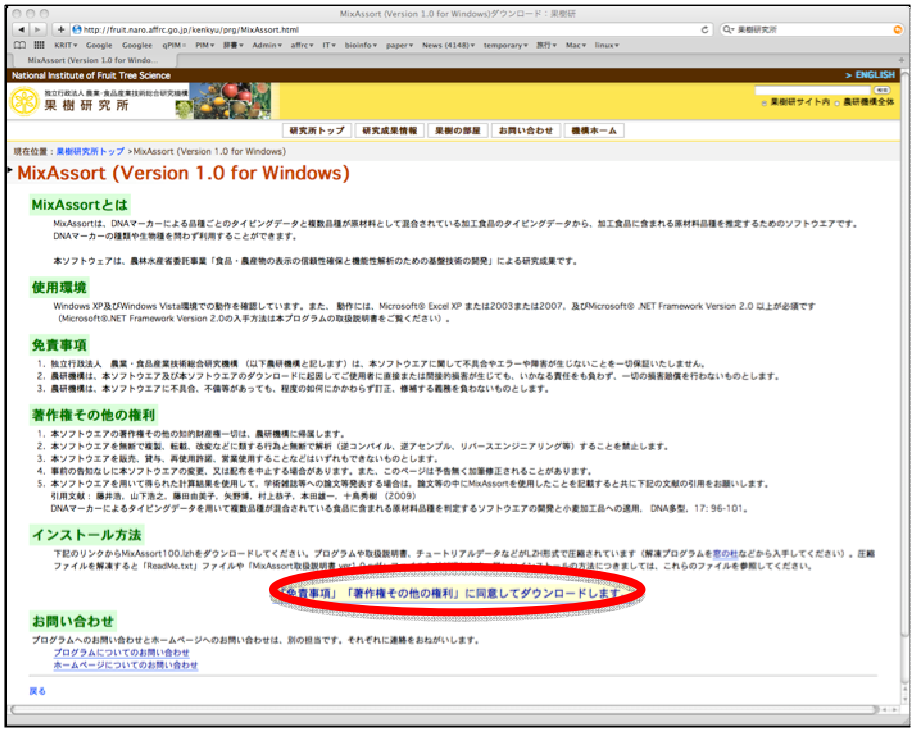
2　DNA マーカー計算の基礎

同じ農作物であっても，品種が異なると，それぞれのゲノムの DNA の塩基配列がわずかに異なる。品種判別用の DNA マーカーは品種間の DNA 配列の違いを実験的な操作によって，電気泳動パターンの差異として視覚化したり，短い塩基配列の繰り返し数の違いとして示すためのものであるといえる。これらの差異は，英文字や数字に置き換えられて，マーカー型一覧表に整理されている。DNA マーカー計算の多くは，このように英数字に置き換えられたマーカー型について，文字列比較を中心とする計算であるので，倍数性にさえ注意すれば，DNA マーカー計算用ソフトウエアは，生物種を問わずに利用することができる。もちろん，生物種ごとの生物学的条件には十分に注意する必要がある。

3　MarkerToolKit と MixAssort の入手方法

MarkerToolKit と MixAssort のダウンロードサイトは，果樹研究所のホームページ（http://fruit.naro.affrc.go.jp/）の左側下の「ゲノム解析プログラム」のリンクから入ることができる。それぞれダウンロードをして，入手していただきたい。





4　MarkerToolKit の使用方法と実習

MarkerToolKit は DNA マーカーを多数の品種に適用して得られた DNA マーカー型一覧表に関する９種類の統計計算や書式変換を簡単な操作で実行するソフトウエアである。２倍体の生物に共優性マーカーを適用した結果であれば，生物種を問わず利用できる。

１）具体的な内容

DNA マーカー型一覧表（表１）に関する下記の９つの計算を自動的に行うことができる。

(1) SSR マーカーの数値表記について，MinimalMarker(最少マーカーセット選択プログラム)の入力書式に合わせてアリルの表記順を昇順に並べ替えて出力

(2) 全ての２品種の組合せで判別可能なマーカー数を出力（図１）

(3) 数値表記のマーカー型を文字表記に変換

(4) 各マーカーのアリル頻度，ヘテロ接合度，多型情報含有値を出力

(5) 各マーカーのマーカー型の種類と頻度を出力

(6) SSR マーカーのアリル間の数値の差の絶対値を出力

(7) SSR マーカーの数値表記を相対表記に変換して出力（表２）

(8) 鵜飼の品種判別理論値（鵜飼，2004）を出力（表３）

(9) 樹形図解析のためにアリルの存在を０／１形式で表記して出力

２．本ソフトウエアへ入力するマーカー型の表記方法は文字表記でも良いし，SSR マーカーのような数値表記でもよい。

３．本ソフトウエアは，２倍体の生物に共優性マーカーを適用した結果であるならば，どのような生物データについても計算可能である。

４．本ソフトウエアは，データの入出力を Microsoft® Excel2003 で行うことができ，また，計算の実行も全て簡単なマウス操作で行えるので，コンピュータの操作に不慣れな研究者でも容易に利用できる。

表1 SSRのサンプルデータ

マーカー 品種	M1	M2	M3	M4	M5
V1	84/80	94/78	193/197	195/177	136/136
V2	84/80	94/78	193/197	195/195	136/136
V3	84/84	88/78	195/197	195/177	132/136
V4	84/80	94/80	193/197	195/177	136/136
V5	80/80	94/80	193/197	195/177	136/136
V6	80/80	94/74	193/197	195/177	116/136
V7	84/80	94/80	193/197	195/177	136/136
V8	84/80	94/78	193/197	195/177	136/136

（Yamamoto *et al*.,2003を改変）

Cultivar	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8
V1		1	4	1	2	3	1	0
V2	1		5	2	3	4	2	1
V3	4	5		4	4	4	4	4
V4	1	2	4		1	3	0	1
V5	2	3	4	1		2	1	2
V6	3	4	4	3	2		3	3
V7	1	2	4	0	1	3		1
V8	0	1	4	1	2	3	1	

図1 表1についてすべての2品種の組合せにおける判別可能なマーカー数を総当りの表の形式で出力した結果.

表2 表1のデータについて数値の絶対表記を相対表記に変換して出力した結果

マーカー 品種	M1	M2	M3	M4	M5
V1	0/+4	0/+16	0/+4	0/+18	0/0
V2	0/+4	0/+16	0/+4	+18/+18	0/0
V3	+4/+4	0/+10	+2/+4	0/+18	-4/0
V4	0/+4	+2/+16	0/+4	0/+18	0/0
V5	0/0	+2/+16	0/+4	0/+18	0/0
V6	0/0	-4/+16	0/+4	0/+18	-20/0
V7	0/+4	+2/+16	0/+4	0/+18	0/0
V8	0/+4	0/+16	0/+4	0/+18	0/0

表3 表1のデータについての鵜飼の品種判別理論値の出力結果

品種	鵜飼の品種判別理論値
V1	0.6853662506
V2	0.1438471797
V3	0.0017077071
V4	0.6853662506
V5	0.3576934570
V6	0.0236768299
V7	0.6853662506
V8	0.6853662506

2)留意点

１．マーカー型データ中には欠測値やヌル値を含まないことが必要である。

２．本ソフトウエアで計算可能なデータサイズは，マーカー数は 250 マーカーまで，品種数は 500 品種まで，また，アリルまたは遺伝子型数は 1 マーカーあたり 62 までである。

３．本ソフトウエアは Microsoft® Visual Basic® 6.0 を用いて作成されており，Microsoft® Excel 2003 をインストールした Windows® XP マシン上で動作する。

３）実習

MarkerToolKit の取扱説明書は，ソフトウエアおよびチュートリアルデータとともにダウンロードすることができる。取扱説明書を見ながら，チュートリアルデータで計算練習を行っていただきたい。次に，配布した CD-R に記録されている練習用データを使って，計算練習を行っていただきたい。

5　MixAssort の使用方法と実習

ソフトウエア MixAssort は, DNA マーカーによる品種ごとのタイピングデータと複数品種が原材料として混合されている加工食品のタイピングデータから，加工食品に含まれる原材料品種を推定し，DNA マーカーの種類や生物種を問わず利用できる。

１）具体的な内容

１．ソフトウエアMixAssort（ミックスアソート）はある農作物を原材料とする加工食品について，品種ごとにDNAマーカーを適用して得られたマーカー型と同じDNAマーカーを加工食品に適用して得られたマーカー型とを入力データとして（表１），該当する加工食品の原材料品種と推定される品種（表２の枠で囲われた品種）をもれなく出力する。

２．MixAssortは，果汁，野菜汁などのジュースや小麦粉，米粉，そば粉，はったい粉といった粉食品など，複数の品種が混合されていることが想定される加工食品のDNAマーカーによる品種判別に適用できる。

３．MixAssortはSSRマーカーのような数値表記のマーカーでも文字表

記のマーカーでも利用可能であり，優性マーカーと共優性マーカーの違いや生物種および倍数性を問わずに利用できる。

表１　入力データの例；複数の原材料品種から製造されている食品 A とその原材料である農作物 12 品種について，10 種類の DNA マーカーを適用して得られたマーカー型の一覧表

マーカー	マーカー1	マーカー2	マーカー3	マーカー4	マーカー5	マーカー6	マーカー7	マーカー8	マーカー9	マーカー10
食品A	BF	BD	C	AB	B	AB	AB	CD	B	AB
品種01	J	E	A	D	B	B	B	C	A	A
品種02	B	E	A	C	A	A	B	A	B	A
品種03	G	A	B	B	B	B	B	A	B	A
品種04	C	D	A	A	B	A	B	C	B	A
品種05	E	D	B	A	B	A	B	C	B	A
品種06	B	D	C	B	B	A	A	D	B	A
品種07	H	D	A	A	B	A	B	B	C	A
品種08	I	D	A	A	B	A	A	C	C	A
品種09	A	C	C	A	B	B	A	D	C	A
品種10	F	B	B	A	B	B	B	C	A	B
品種11	F	B	C	A	B	B	B	C	B	B
品種12	D	C	A	A	B	A	A	B	C	B

表２　MixAssort の動作原理を示した表；表 1 について，マーカーごとに食品 A のマーカー型と各品種のマーカー型とを比較し，食品 A のマーカー型と矛盾する品種のマーカー型を白抜き文字で示す。すべてのマーカーについて食品 A のマーカー型と矛盾しない品種（品種 06，品種 11）を枠で示す。

マーカー	マーカー1	マーカー2	マーカー3	マーカー4	マーカー5	マーカー6	マーカー7	マーカー8	マーカー9	マーカー10
食品A	BF	BD	C	AB	B	AB	AB	CD	B	AB
品種01	J	E	A	D	B	B	B	C	A	A
品種02	B	E	A	C	A	A	B	A	B	A
品種03	G	A	B	B	B	B	B	A	B	A
品種04	C	D	A	A	B	A	B	C	B	A
品種05	E	D	B	A	B	A	B	C	B	A
品種06	B	D	C	B	B	A	A	D	B	A
品種07	H	D	A	A	B	A	B	B	C	A
品種08	I	D	A	A	B	A	A	C	C	A
品種09	A	C	C	A	B	B	A	D	C	A
品種10	F	B	B	A	B	B	B	C	A	B
品種11	F	B	C	A	B	B	B	C	B	B
品種12	D	C	A	A	B	A	A	B	C	B

2)留意点

1．ミックスジュースのように複数の樹種の果汁が混合されている場合は，生物種ごとの DNA マーカー型のデータについて，本ソフトウエアを適用すると便利である。

2．本ソフトウエアは，各 DNA マーカーあたり，52 の DNA マーカー型まで対応する。

3．本ソフトウエアは Microsoft® Visual Studio® 2008 を用いて作成されており, Microsoft® Excel 2003 または Excel 2007 をインストールした Microsoft® Windows®マシン上で動作する。

3）実習

MixAssort の取扱説明書は，ソフトウエアおよびチュートリアルデータとともにダウンロードすることができる。取扱説明書を見ながら，チュートリアルデータで計算練習を行っていただきたい。次に，配布した CD-R に記録されている練習用データを使って，計算練習を行っていただきたい。

6　その他の DNA マーカー計算ソフトウエア

果樹研究所では, MarkerToolKit や MixAssort の他に, マーカー型一覧表のすべての品種を判別するために必要な最少の品種判別マーカーのセットを選択するためのソフトウエア MinimalMarker や, シロイヌナズナのゲノム情報を利用して, 果樹の断片的遺伝子配列（EST）のエクソンーイントロン構造を予測するためのソフトウエア MAEZATO などを開発しており, 順次公開していく予定である。

7　用語説明

・DNA マーカー：DNA 塩基配列の品種間での違いをもとに，ゲノム上の標識（目印）としたもの。染色体上の遺伝子内あるいはその近傍の塩基配列に違いがあり，その違いを識別できれば，DNA マーカーとして利用できる。DNA マーカーによって，特定の遺伝子を含む染色体のある領域が親から子へ受け継がれたかどうか検定できる。

・SSR マーカー：DNA マーカーの種類のうちのひとつ。ゲノム上の塩基配列の短い繰り返し部分の長さの違いを利用して品種を判別する DNA マーカーである。こ

のため SSR マーカーは数字で示される。2倍体の生物の場合，80/84 のように2つの数字で示される。多型性が高いので品種判別に有効である。

・ アリル（対立遺伝子）：生物を集団で見るとき，染色体上の相同な遺伝子座を占める遺伝子に複数の種類がある場合の，それぞれの遺伝子のこと。

・ アリル頻度：生物を集団で見るとき，アリルの関係にある複数の種類の遺伝子のそれぞれが，集団内に存在する頻度。

・ ヘテロ接合度：生物を集団で見るとき，遺伝子座におけるヘテロ接合体の割合。２倍体の生物の場合，父方と母方の２本の染色体があり，相同な１組の遺伝子座が存在する。その二つの遺伝子座を同じ種類の遺伝子（アリル）が占めている場合をホモ接合体，異なる種類の遺伝子（アリル）が占めている場合をヘテロ接合体という。ヘテロ接合度が高いほど，DNA マーカーとしての判別力が高い。

・ 多型情報含有値：ヘテロ接合度と同様に，ヘテロ接合性を評価する指標のひとつ。この値が高いほど DNA マーカーとしての判別力が高い。

・鵜飼の品種判別理論値：ある作物で，品種未知のサンプルが現れたとき，表１に示された品種の中に品種未知のサンプルと全く同一のマーカー型を示す品種が１品種以上存在する確率（鵜飼, 2004）。

参考資料　その1

DNA品種識別技術の実習マニュアル

果樹研究所果樹ゲノム研究チーム

ニホンナシの DNA 品種識別実験マニュアル

独立行政法人農業・食品産業技術研究機構

果樹研究所

ニホンナシの DNA 品種識別実験

目次

１．方法の要旨
２．検査試料
３．機器・プログラム
４．実験操作
4-1. 操作準備作業
4-2. 操作場所
4-3. 試薬および器具
4-4. DNA 抽出操作１
4-5. DNA 抽出操作２
4-6. DNA の定量
4-7. PCR 増幅操作
4-8. SSR マーカーの検出方法
4-9. データ解析、判定
4-10. 実験操作フロー図
参考文献

1. 方法の要旨

ゲノム中に豊富に散在している 2-数塩基の反復配列を挟み込むように設計したプライマーを用いて、PCR 増幅断片長の差異を蛍光 DNA シーケンサーで分析する。反復配列領域は、その反復回数に突然変異を起こしやすいと言われており、塩基置換と比較して変異頻度が 1-2 ケタ大きいとされている。SSR-PCR された DNA 断片の長さを高精度で分析することにより、近縁な品種同士でも判別が可能である。

ナシで利用する 17 種類の SSR マーカーは、ニホンナシ品種「豊水」またはセイヨウナシ品種「バートレット」から、(AG)/(TC)もしくは(AC/TG)のモチーフをターゲットとしてゲノム濃縮ライブラリーを作成し、そのクローンの配列を基に、農研機構・果樹研究所が単独であるいは（独）種苗管理センターと共同で開発したものである。

2. 検査試料

葉、果実、穂木の花芽と葉芽を検査試料対象とし、病害、虫害、その他の被害を受けていない健全な組織を用いる。

葉では、できるだけ若い未展開の葉を用いて、生葉、凍結乾燥葉、凍結保存葉を使用する。いずれの方法でも良好な結果が得られる。凍結保存後にDNA抽出を行う場合には、保存前に、生のときに必要量を計量してから、ビニール袋などに入れ密封し、-80℃のディープフリーザーで保存する。

DNA抽出の際には、-80℃のフリーザーからサンプルを出して、できる限り短時間（1-3 分以内）に扱うことが重要である。ナシの葉には、ポリフェノール類が多く含まれ、褐変しやすい。褐変した葉サンプルでは、経験的に純度や精製度が劣るDNAが抽出されるため、SSRマーカーでの分析時に問題が起きることが多い。凍結保存には、-20℃では不十分で、-80℃のディープフリーザーが必要である。また、凍結保存したサンプルを室温で長時間放置すると葉の褐変が起こるので、注意を要する。完全展開葉、シリカゲルで乾燥させた葉、押し葉標本の葉では、うまくDNAが抽出できない場合があるので注意を要する。

生果実では、果皮を用いてDNA抽出を行う。葉からの抽出と比較して、果皮からのDNA収量はかなり少ない。葉の場合と同様に、生のままDNA抽出サンプルとして供試することで、良好な結果が得られる。凍結保存後にDNA抽出を行う場合には、保存前に、生のときに必要量を計量してから、ビニール袋などに入れ密封し、-80℃のディープフリーザーで保存する。DNA抽出の際には、-80℃のフリーザーからサンプルを出して、できる限り短時間（1-3 分以内）に液体窒素中に入れて、粉砕を行う。凍結保存には、-20℃では不十分で、

表１　用いたSSRマーカーのプライマー配列などの特徴

SSR マーカー	アニーリング温度 (℃)	プライマー配列 (5'-3') Forward	Reverse	ターゲットサイズ(bp)	連鎖地図上の座乗連鎖群No.
BGT23b	55	CACATTCAAAGATTAAGAT	gtttcttACTCAGCCTTTTTTTCCCAC	203+8	2
KA14	55	TCATTGTAGCATTTTTATTTTT	gtttcttATGGCAAGGGAGATTATTAG	180+8	16
NH004a	50	AGGATGGGACGAGTTTAGAG	gtttcttCCACATCTCTCAACCTACCA	113+8	14
NH005b	55	TGAGAAGAATTAGCCATGATGA	gtttcttTTACTACTTGCGTGCGTTCC	338+8	8
NH007b	55	TACCTTGATGGGAACTGAAC	gtttcttAATAGTAGATTGCAATTACTC	150+8	16
NH009b	50	CCGAGCACTACCATTGA	gtttcttCGTCTGTTTACCGCTTCT	159+8	13
NH011b	55	GGTTCACATAGAGAGAGAGAG	gtttcttTTTGCCGTTGGACCGAGC	181+8	4
NH014a	52	CAAACCTAACCCTAAATACC	gtttcttTGTTCATATATTCATCACTC	86+8	17
NB103a	50	TTGTAGGGAAAATGATGCCA	GTGTTGATACTCTCTCTCTC	127	5
NH025a	55	CTGGACACAAACATTCAAGAGGG	CACACCAGAAACTCCAAAACAGG	99	15
NH029a	55	GAAGAAAACCAGAGCAGGGCA	CCTCCCGTCTCCCACCATATTAG	85	9
NH039a	55	TGGTTGCCGAGAAAGTGTAG	CAAGCAAGTACAACATGAGTGG	132	10
NH204a	55	TACAAATAAATTGTTTCAATGAGCA	gtttcttATAGGCAAAGAAAAATAATGTCC	137	15
NH207a	55	ATTTATAGTTGAGGCCATGAGG	gtttcttCCCGAATGGAAAGTATGTTATC	160	12
NB114a	55	gtttcttTGTCTTCTCTCTCCGCTTATTC	AAGAAATAAAACCCACAAAGCC	123+8	8
NB135a	55	TGAGAGAAGAACAGCCAATGAT	gtttcttCTCCCACTCAGATCGCTCCT	169+8	11
NB141b	55	gtttcttCAGAGAAAGACAGAGGTAGAGAGAA	GGATTGATCGCCTTATGGTTGT	126+8	4

-80℃のディープフリーザーが必要である。また、凍結保存したサンプルを室温で長時間放置すると劣化・褐変が起こるので、注意を要する。
穂木では、十分に充実した穂木の花芽や葉芽を用いることで、DNA抽出が可能である。１月以降にサンプリングした穂木の花芽や葉芽は、十分に充実しており分析に供試できる。花芽単独、葉芽単独、および花芽と葉芽を混合したサンプルからのDNA抽出が可能である。

3. 機器・プログラム

1) 推奨機器：PCR システム GeneAmp PCR System 9700（アプライドバイオシステムズ社）
2) ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer（アプライドバイオシステムズ社）もしくはこれに準じる蛍光 DNA シーケンサー
3) GeneScan ソフトウエア（アプライドバイオシステムズ社）もしくはこれに準じるソフトウエア
4) 高速冷却遠心機（50 ml 遠沈管が使用可能なもの）
5) 高速冷却遠心機（1.5-2 ml チューブが利用可能なもの）
6) 電気泳動装置（アドバンス社、Mupid など）
7) 紫外線照射装置
8) 写真撮影装置
9) 電子天秤
10)オートクレーブ
11)乾熱滅菌器
12)超純水製造装置
13)ウォーターバス

4. 実験操作

4-1. 操作準備作業

DNA 実験操作は、実験台上をエタノールで消毒し、また必要に応じてクリーンベンチを使用する。実験操作時は、白衣、ゴム手袋、眼鏡、上履きを着用する。

4-2. 操作場所

DNA 抽出から PCR 増幅、DNA シーケサー分析まで、供試サンプル以外の DNA が混入しないクリーンな環境で操作する。

4-3. 試薬および器具

・50 ml 遠沈管（ポリプロピレン製、滅菌済み）
・1.5 ml チューブ（滅菌済み）
・2 ml チューブ（滅菌済み）
・メルカプトエタノール（最近毒物に指定された、取り扱い注意）

・Polyclar AT（不溶性ポリビニルピロリドン）
・乳鉢・乳棒（滅菌済み、乾熱滅菌 180℃２時間）
・薬サジ（滅菌済み、乾熱滅菌 180℃２時間）
・液体窒素
・G2 buffer、QBT buffer、QC buffer、QF buffer（キアゲン社指定の組成）
・RNase（100 mg/ml、キアゲン社）
・Genomic-tip 20/G カラム（キアゲン社）
・1/10 TE バッファー（EDTA の濃度を 0.1 mM にした TE バッファー）
・Buffer AP1、Buffer AP2、Buffer AP3/E、Buffer AW（キアゲン社 DNeasy Plant Mini Kit に添付のもの）
・QIAshredder spin column、DNeasy Mini spin column、コレクションチューブ（キアゲン社 DNeasy Plant Mini Kit に添付のもの）
・色素液（30 %グリセロール、0.25 %ブロモフェノールブルー、0.25 %キシレンシアノール）
・λDNA 溶液（10 µl あたり 10 ng、30 ng、100 ng、300 ng に調製したもの）
・0.8-1.5 %アガロースゲル
・TE バッファー
・エチジウムブロマイド溶液（TE バッファーに、0.5-1.0 µg/ml の濃度でエチジウムブロマイドを加えた溶液）
・96 穴 PCR プレート（アプライドバイオシステムズ社）
・キャップまたはフルプレートカバー（アプライドバイオシステムズ社）、
・AmpliTaq DNA Polymerase（アプライドバイオシステムズ社）
・PCR バッファー（アプライドバイオシステムズ社）
・2 mM に調製した dNTPs（dATP、dTTP、dCTP、dGTP を TE バッファーで混合した溶液、タカラバイオ社）
・滅菌超純水
・SSR プライマー溶液（蛍光ラベルされたフォワードプライマーとリバースプライマーを各 10 pmol/µl 含む溶液、1/10 TE バッファーで希釈）
・384 穴プレート（アプライドバイオシステムズ社）
・Genetic Analyzer Buffer with EDTA（アプライドバイオシステムズ社）
・Hi-Di Formamide（アプライドバイオシステムズ社）
・3100 POP-4 ポリマー（アプライドバイオシステムズ社）
・3100/3130xl 36cm Capillary Array (47 cm x 50 µm、アプライドバイオシステムズ社)
・GeneScan 400HD ROX サイズスタンダード（アプライドバイオシステムズ社）

溶液類は熱に不安定なものを除いて、オートクレーブ滅菌を行う。純水は電気伝導率 0.0056 mS/m （25 ℃）以下になるように脱イオン化されたものを用い、さらに精製された超純水を用いるのが望ましい。滅菌水は純水を 121℃、15 分以上オートクレーブで処理したものを用いる。

特別の指定がある試薬はそれに従い、その他については JIS 特級試薬（あるいは同等のグレード）を用いること。

チップやチューブ類は、滅菌済みのものを用い、必ず使い捨てとする。また、コンタミネーションを防ぐため、滅菌済みのフィルターチップを使用する。

マイクロピペットのチップ類、その他ピペット類及び 1.5 ml と 2.0 ml 等のチューブは、滅菌缶に入れオートクレーブ滅菌し、その後、乾燥器に入れ、完全に乾燥してから用いる。可能なものについては乾熱滅菌を行う。あるいは、滅菌済みの市販品を用いる。

4-4. DNA抽出操作１（Genomic-tip 20/G＋G2 バッファー法）

Genomic-tip 20/G と G2 バッファーを用いる方法＝DNA 抽出操作１、DNeasy Plant Mini Kit を用いる方法＝DNA 抽出操作２を記した。DNA 抽出操作１の方法では、純度や精製度の高い DNA が抽出可能であり、信頼度の高い DNA 分析を行うために、より適した方法である。一方、実験操作がやや複雑で時間がかかること、スケールが大きくなるので多検体分析への適用が困難であること、大型の冷却遠心機が必要など機械や設備の制約を受けることが欠点である。DNA 抽出操作２の方法では、実験スケールが小さく、短時間で多検体を扱うことが可能であるメリットの反面、夾雑物の多いサンプルや加工度の高いサンプルでは、純度の高い DNA が得られにくいデメリットがある。適切にサンプリングされた葉、果実、穂木では、いずれの方法でも、DNA 品種識別に利用可能な質を持つ DNA の抽出が可能である。

Genomic-tip 20/G と G2 バッファーを用いる DNA 抽出の基本操作は、キアゲン社のプロトコールに従っているが、バッファーの液量など一部を修正している。キアゲン社のプロトコール通りでも問題なく DNA 抽出が可能である。

1) 50 ml 遠沈管（ポリプロピレン製）に、10 ml の G2 buffer、200 µl のメルカプトエタノール、100 mg の Polyclar AT、2 µl の RNase を加える。
2) 約 1 g のサンプルを液体窒素中で、凍結状態で粉砕した後、粉砕サンプルを上記バッファーに加える。
3) 2 本ずつ重さのバランスを調節した後、ウォーターバスで、50℃2 時間インキュベートする。途中で、2-3 回上下反転混和する。
4) 高速冷却遠心機（佐久間製作所製 50A-IV、ロータ 50F-12A）で、6,000 rpm、30 分間、4℃で遠心し、上清を 50 ml の新しい遠沈管に移す。
5) Genomic-tip 20/G カラム（以下カラム）を、2 ml の QBT buffer で平衡化しておく。
6) 上記 5)で得た上清を 2 ml ずつ数回に分けて、カラムに通す。
7) QF buffer をウォーターバスで 50℃に温めておく（サンプル数×2 ml）。
8) 2 ml の QC buffer をカラムに通す。
9)再度、2 ml の QC buffer をカラムに通す。
10)カラムの下に 2 ml チューブを置き、50℃で温めておいた 1 ml の QF buffer を加え、DNA を溶出させる。
11)2 ml チューブを交換し、10 の操作を再度繰り返し、DNA 溶出液を得る。
12)上記 10)および 11)で得られた溶出液に、0.7 ml のイソプロパノールを加え、

20-30 回上下反転混和するなどして、よく混合する。

13)-20℃で 30 分間静置後、冷却遠心機（TOMY 社製 MX-160、ロータ TMA-24）で、14,000 rpm、20 分間、4℃で遠心する。

14)上清を捨て、500 µl の 70%エタノールを加え、14,000 rpm、10 分間、4℃で遠心する。

15)上清を捨て、スピードバックなどを用いて乾燥させる。

16)200 µl の 1/10 TE に溶かす。

17)4℃で静置保存し、3 日後くらいに DNA が溶解してから、電気泳動法により、抽出 DNA の濃度をチェックする。

・G2 buffer の組成と調製方法

試薬	最終濃度	使用量
8M Guanidine HCl	800 mM	100 ml
1M Tris-HCl (pH 8.0)	30 mM	30 ml
0.5M EDTA (pH 8.0)	30 mM	60 ml
Tween-20	5%	50 ml
Triton X-100	0.50%	5 ml
滅菌超純水		755 ml
合計		1000 ml

・QBT buffer の組成と調製方法

試薬	最終濃度	使用量
5M NaCl	750 mM	30 ml
1M MOPS (pH 7.0)	50 mM	10 ml
Isopropanol	15%	30 ml
Triton X-100	0.15%	0.3 ml
滅菌超純水		129.7 ml
合計		200 ml

・QC buffer の組成と調製方法

試薬	最終濃度	使用量
5M NaCl	1 M	80 ml
1M MOPS (pH 7.0)	50 mM	20 ml
Isopropanol	15%	60 ml
滅菌超純水		240 ml
合計		400 ml

・QF buffer の組成と調製方法

試薬	最終濃度	使用量
5M NaCl	1.25 M	50 ml
1M Tris-HCl (pH 8.5)	50 mM	10 ml
Isopropanol	15%	30 ml
滅菌超純水		110 ml
合計		200 ml

4-5. DNA抽出操作2（DNeasy Plant Mini Kitを用いる方法）

基本操作は、キアゲン社の DNeasy Plant Mini Kit のプロトコールに従っているが、バッファーの液量など一部修正箇所あり。キアゲン社のプロトコール通りでも問題なく DNA 抽出が可能である。

1) サンプル約 100 mg を、計量する。
2) 液体窒素中で、ペッスルと 1.5ml チューブ、または乳鉢・乳棒などを利用して、サンプルを凍結状態で粉砕する。乳鉢・乳棒を使用する場合は、粉砕後のサンプルを 1.5 ml チューブに入れる。
3) ウォーターバスで 65℃に温めておいた 450 µl の Buffer AP1 と 8 µl のメルカプトエタノールを 1.5 ml チューブに加えた後、手で強く上下に振ってサンプルの塊がない程度に混和する。65℃で 10 分間静置する。途中で、2-3 回上下反転混和する。

※RNase 処理を行う場合は、4 µl の RNase A (キットに添付のもの、100 mg/ml) を加える。

4) 150 µl の Buffer AP2 を加え、軽く混合した後、氷上で 5 分間静置する。
5) 冷却遠心機（TOMY 社製 MX-160、ロータ TMA-24）で、14,000 rpm、10 分間、15℃で遠心する。
6) 上記 5)の遠心分離で得られた上清を、QIAshredder spin column（紫色）に加え、14,000 rpm、2 分間、15℃で遠心する。
7) QIAshredder spin column を通して得られた液に、800 µl の Buffer AP3/E（エタノール添加を確認）を加え、ピペッティングにより混合する。
8) 上記 7)で得られた混合液のうち 650 µl を、DNeasy Mini spin column（白色）に加える。
9) 12,000 rpm、1 分間、15℃で遠心した後、溶出液を捨てる。
10) 上記 7)で得られた混合液の残りを、DNeasy Mini spin column（白色）に加え、12,000 rpm、1 分間、15℃で遠心した後、溶出液を捨てる。
11) DNeasy Mini spin column を、新しいコレクションチューブ内に移し、500 µl の Buffer AW（エタノール添加を確認）を加え、12,000 rpm、1 分間、15℃で遠心した後、溶出液を捨てる。
12) DNeasy Mini spin column に 500 µl の Buffer AW（エタノール添加を確認）を加え、12,000 rpm、1 分間、15℃で遠心した後、溶出液を捨てる。
13) 再度、12,000 rpm、1 分間、15℃で遠心し、溶液を除去する。
14) DNeasy Mini spin column を 1.5 ml チューブに移す。
15) ウォーターバスで 65℃に温めておいた 100 µl の 1/10 TE を加え、5 分間静置した後、10,000 rpm、1 分間、15℃で遠心し、DNA 溶出液を得る。
16) 再度、65℃に温めておいた 100 µl の 1/10 TE を、DNeasy Mini spin column に加え 5 min 静置した後、10,000 rpm、1 分間、15℃で遠心し、DNA 溶出液を得る。

4-6. DNA の定量

抽出したDNAの定量方法には、アガロースなどの電気泳動による分析や分光光度計による分析がある。前者のアガロース電気泳動では、正確なDNA量の値は算出されないが、抽出されたDNAの量、抽出時のDNA分解程度（DNAの長さや移動度）や夾雑物の影響の有無を確認することができる。ここでは、電気泳動法による定量方法について記す。図 1 に、DNA抽出操作 1（Genomic-tip 20/G＋G2 バッファー法）で抽出したニホンナシ品種のゲノムDNAの電気泳動の写真を、図 2 に、DNA抽出操作２（DNeasy Plant Mini Kitを用いる方法）で穂木の芽から抽出したDNAの電気泳動の写真を示す。

1) 2 µl のサンプル DNA 溶液に、6.5 µl の 1/10 TE バッファーと 1.5 µl の色素液を加えて、よく混合する。
2) 調製したサンプル DNA 溶液、10 µl あたり 10 ng、30 ng、100 ng、300 ng に調製した λDNA 溶液を、0.8-1.5 %アガロースゲルに、10 µl アプライする。
3) 電気泳動装置で、100V30 分間程度、電気泳動を行う。
4) 電気泳動済みのアガロースゲルを、エチジウムブロマイド溶液中で 15-45 分間静置して、染色する。
5) 紫外線照射装置で 254 nm や 366 nm などの紫外線を照射し、写真撮影装置で撮影する。図 2 に電気泳動図を示す。
6) DNA 濃度を決定し、SSR 分析用に、5-10 ng/µl の DNA 溶液を作成する。
7) DNA 溶液は-20℃以下で、凍結保存する。

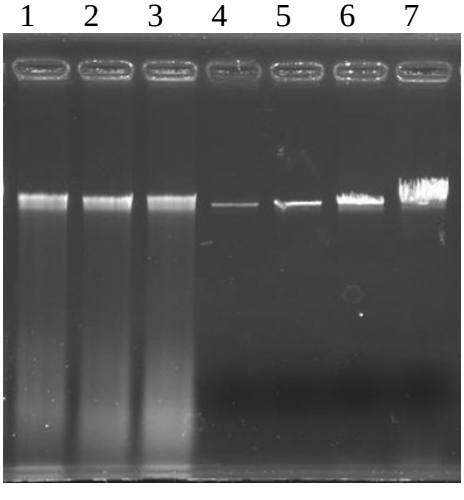


図 1．電気泳動図
1) DNA 抽出操作 1 で抽出したニホンナシ品種豊水の DNA、2) 二十世紀の DNA、3)あきづきの DNA、4) 10 ng の λDNA、5) 30 ng の λDNA、6) 100 ng の λDNA、7) 300 ng の λDNA

※抽出された DNA の量はλDNA の濃さとの比較で定量し、抽出時の分解程度は DNA の移動度で評価し、夾雑物の影響の有無は電気泳動の流れ方（ウエルの幅と同程度に DNA が流れているかどうか）を判断の目安とする。
※DNA 抽出操作２で抽出したニホンナシ品種の DNA も、図１とほぼ同等の電気泳動図である。

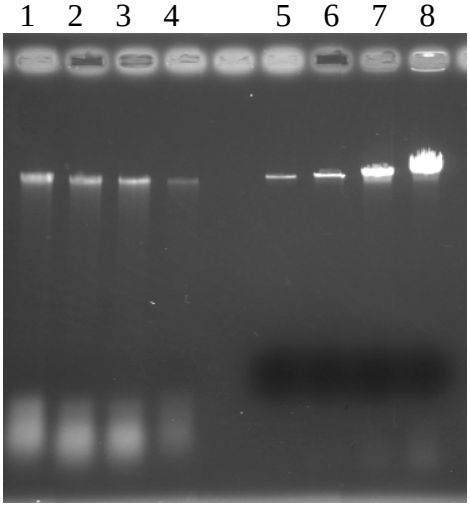


図２．電気泳動図
1) DNA 抽出操作２で穂木の花芽 1 ケから抽出した DNA、2) 穂木の花芽 2 ケから抽出した DNA、3) 穂木の花芽 3 ケから抽出した DNA、4) 穂木の葉芽 1 ケから抽出した DNA、5) 10 ng のλDNA、6) 30 ng のλDNA、7) 100 ng のλDNA、8) 300 ng のλDNA

4-7. PCR 増幅操作

PCR 増幅操作は以下の通りである。なお、PCR 実験では、微量の鋳型 DNA であっても増幅されるので、目的以外の DNA の混入を防ぐとともに、試料の酵素的分解を防ぐため、人間の皮膚表面から分泌されている DNase の混入を防止しなければならない。コンタミネーション防止のため、適切な操作を行う必要がある。

1) PCR 反応液の調製

AmpliTaq DNA Polymerase	0.1 µl
PCR バッファー	2.0 µl
dNTPs	2.0 µl
SSR プライマー溶液	1.0 µl
滅菌超純水	13.9 µl
サンプル DNA 溶液（5-10 ng/µl）	1.0 µl
合計	20.0 µl

2) PCR システム GeneAmp PCR System 9700 を用いて、以下のプログラムで、PCR 反応を行う。アニーリング温度は、表 1 に記載の温度を採用する。

・94℃5 分間熱変性。
・94℃1 分間、50-55℃1 分間、72℃2 分間の反応を、35 サイクル。
・72℃7 分間の反応後、10℃で∞。

3) 反応終了後、-20℃で保存する。

＊トラブルシューティング－SSR-PCR 反応で増幅がうまくいかない－
1) 抽出 DNA の質や夾雑物の混在に問題がある場合、テンプレート DNA を滅菌超純水で 5-10 倍希釈することで、増幅が向上する。
2) 4-4 の DNA 抽出操作 1（Genomic-tip 20/G＋G2 バッファー法）で DNA 抽出を行うことにより、PCR 増幅が向上する。
3) PCR 機の温度制御は、メーカー／機種によって異なるため、PCR システム GeneAmp PCR System 9700（アプライドバイオシステムズ社）を推奨機器としている。異なるメーカー／機種を用いて、SSR-PCR 反応の増幅が悪い場合、アニーリング温度を 2-5℃下げる。一方、非特異的なバンドが多数出る場合には、アニーリング温度を 2-5℃上げる。

4-8. SSR マーカーの検出方法

前項で得た SSR マーカーによる PCR 産物を DNA シーケンサーで分析し、フラグメント解析を行う。基本的分析操作は、アプライドバイオシステムズ社のフラグメント解析のプロトコールに従って行う。

1) 前項で得た PCR 産物を、TE バッファーで 20-100 倍に希釈する。希釈倍率は、PCR 増幅を考慮し、フラグメント解析に適した倍率で行う。
2) 1.5 µl の希釈 PCR 産物、0.17 µl の 400HD ROX サイズスタンダード、8.33 µl の Hi-Di ホルムアミドを、96 穴 PCR プレートまたは 384 穴プレートに入れ、混合する。
3) PCR システム GeneAmp PCR System 9700 などを用いて、95℃5 分間熱変性を行った後、直ちに氷上で 5 分間以上静置する。
4) ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer のプロトコールに従い、36cm キャピラリー、POP-4 ポリマー、専用のバッファー（Genetic Analyzer Buffer with EDTA）を用いて、分析を行う。
5) GenaScan ソフトウエアを用いて、結果の解析を行う。

4-9. データ解析、判定

SSR 遺伝子型の判定は、ニホンナシ品種「豊水」の小さい方の対立遺伝子を「A」として、その値から何 bp 離れているかで表示した（表 2）。たとえば、

BGT23b マーカーでは、「豊水」の小さい方の対立遺伝子 196（フラグメント解析・波形図の値 196.10）を A とし、もう一つの対立遺伝子を A+30（フラグメント解析・波形図の値 226.21）とする。「豊水」の遺伝子型を「A/A+30」、「幸水」の遺伝子型を「A+30/A+30」、「二十世紀」の遺伝子型を「A/A+30」、「あきづき」の遺伝子型を「A/A+30」と表している。

表 2 に、「豊水」、「幸水」、「二十世紀」、「あきづき」、「新高」、「ゴールド二十世紀」、「新興」、「長十郎」、「南水」、「新水」、「愛宕」、「王秋」、「なつしずく」の 13 品種の 17 SSR マーカーの遺伝子型を示した。また、添付の資料２に、全 17 種類の SSR マーカーでの「豊水」、「幸水」、「二十世紀」、「あきづき」4 品種の波形図を示し、各品種の対立遺伝子を塗りつぶして矢印で図示した。ニホンナシ 96 品種の分析で、同一の遺伝子型を示したものが 13 品種存在した。これ以外の品種は、複数の SSR マーカーの差異で、DNA 品種識別が可能であった。

SSR マーカーの開発時に、一方のプライマーおよびプライマー対の Tm 値、プライマーダイマーやヘアピン構造を考慮して、プライマーを作成している。50℃～60℃までアニーリング温度を検討して、至適アニーリング温度の決定を行い、波形を安定させるためのテイル（gtttctt）をプライマーに付加している。しかしながら、供試品種数が多くなると、対立遺伝子間の「競合」でピークの高さがかなり違っている場合、ピークがやや判別しにくい場合が出てくる。このような時には、親子関係が正しい両親と子供で、対立遺伝子が遺伝しているか否かを確認することで、対立遺伝子の正確な同定が可能となる。

本マニュアルは、主にニホンナシ品種で最適化されたものであり、チュウゴクナシ、セイヨウナシや近縁野生種と遺伝的に関係の深い品種を対象にする場合は、本 17 種類の SSR マーカーの中で正確な結果を得ることが困難なマーカーを除外して解析を行うなど、注意が必要である。

以下、データ解析、判定に際しての注意点を記す。

1) 全ての蛍光色素を表示して解析すること。これにより、PCR 増幅産物の希釈濃度が濃すぎることによって生じるフラグメントの乱れをチェックすることが可能である。サンプル濃度が濃いと、本来フラグメントのピークとして検出されるはずのない色が検出されることがあり、ターゲットのフラグメントの正しい値を表していないことがある。
2) サイズスタンダードのピークと比較して適正な希釈濃度とすること。PCR 増幅産物の希釈濃度が薄い場合、サイズスタンダードのピークと比較して、サンプルのピークが低くなる。最も高いフラグメントのピークがサイズスタンダードの 1/3 以下の場合は別の低いフラグメントのピークを見落とす危険があるため、注意が必要である。明確に判断できない場合は、希釈をやり直して、再度分析を行う。また、希釈濃度が濃すぎるとピークの大きさが検出限界を超えてしまい、ピークの先端が表示されない。この場合、フラグメントのサイズデータが正しく表示されないため、PCR 産物の希釈をやり直して再度分析を行う。
3) サイズスタンダードの波形を確認すること。フラグメント解析におけるピークの数値は、サイズスタンダードのピークサイズをもとに作成した検量線

によって計算されるため、サイズスタンダードの波形が乱れていると、正しいデータが計算できない。よってサイズスタンダードの波形が乱れていた場合は分析をやり直す。

4) 遺伝子型判定のために複数の標準品種を供試すること。フラグメント解析では、DNA シーケンサーの機種、ポリマー、キャピラリー、サイズスタンダードなどの違いにより、計算上の対立遺伝子のサイズ（フラグメントのピークサイズのこと）がずれる場合がある。一方、これらの実験条件や解析条件が同一の場合、安定した対立遺伝子のサイズが得られる。よって、異なるラボや異なる解析条件での結果を比較するために、複数の標準品種が必要である。ニホンナシ品種「豊水」、「幸水」が標準品種として利用可能である。絶対値ではなく、相対値のデータを用いることで信頼姓が確保できる。SSR 遺伝子型の判定は、ニホンナシ品種「豊水」の小さい方の対立遺伝子を「A」として、その値から何 bp 離れているかで表示する。

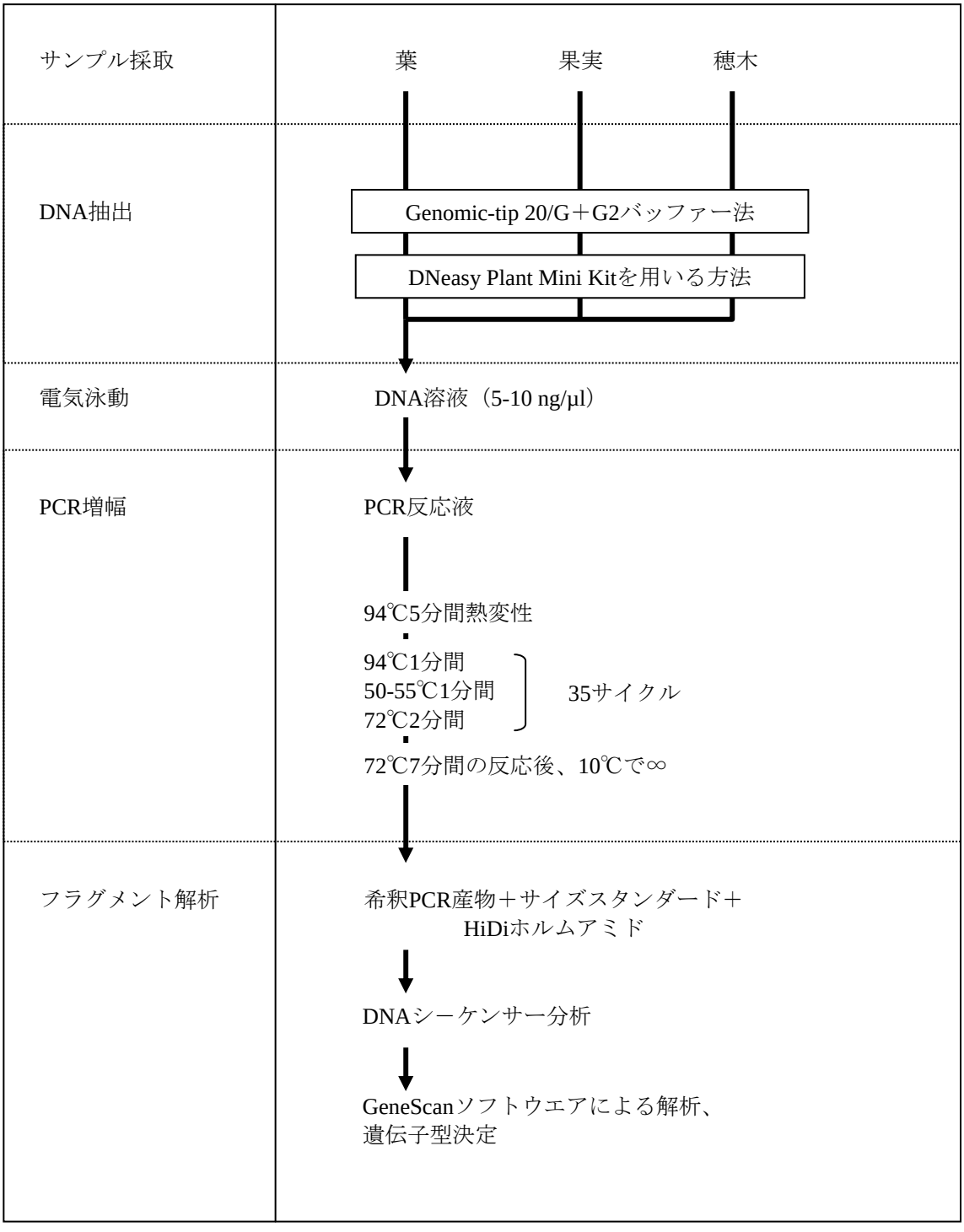
表2　ニホンナシ13品種、17SSRマーカーの遺伝子型

	SSRマーカー								
	BGT23b	KA14	NH004a	NH005b	NH007b	NH009b	NH011b	NH014a	NB103a
豊水	A/A+30	A/A	A/A+37	A/A+4	A/A	A/A	A/A	A/A+17	A/A
幸水	A+30/A+30	A/A	A/A+22	A-16/A	A-28/A	A/A	A-8/A	A/A+27	A/A
二十世紀	A/A+30	A/A	A+22/A+37	A-16/A+4	A-28/A	A/A	A-8/A	A+27/A+27	A/A
あきづき	A/A+30	A/A	A+22/A+37	A/A+4	A/A	A/A	A/A	A+17/A+27	A/A
新高	A/A+10	A/A	A+22/A+37	A-16/A+4	A-28/A-10	A-12/A	A/A+2	A/A+17	A/A+14
ゴールド二十世紀	A/A+30	A/A	A+22/A+37	A-16/A+4	A-28/A	A/A	A-8/A	A+27/A+27	A/A
新興	A/A	A/A	A+37/A+37	A+4/A+4	A-28/A	A-4/A	A-8/A+2	A/A+27	A/A+14
長十郎	A/A+10	A/A	A+22/A+30	A-16/A+4	A-28/A	A/A	A-8/A	A/A+17	A/A+14
南水	A+10/A+30	A/A	A/A+37	A-16/A+4	A-12/A-10	A/A	A/A	A/A+27	A/A+14
新水	A+18/A+30	A/A	A/A	A/A+4	A-28/A-12	A-18/A	A/A	A+8/A+27	A/A+18
愛宕	A/A+10	A/A	A/A+30	A+4/A+4	A-28/A	A-4/A	A-8/A+2	A/A	A/A+14
王秋	A/A+34	A/A	A+22/A+37	A-16/A-16	A-14/A	A-18/A	A/A+58	A+8/A+27	A/A+14
なつしずく	A+30/A+30	A/A	A/A+22	A-16/A	A/A	A/A	A/A	A/A+17	A/A
備考	A=196	A=184	A=81	A=346	A=154	A=163	A=186	A=71	A=82

表2　ニホンナシ13品種、17SSRマーカーの遺伝子型（続き）

	SSRマーカー							
	NH025a	NH029a	NH039a	NH204a	NH207a	NB114a	NB135a	NB141b
豊水	A/A+16	A/A	A/A+11	A/A+10	A/A	A/A+2	A/A	A/A
幸水	A-15/A+16	A/A	A/A	A-2/A	A/A	A/A+2	A/A	A/A
二十世紀	A-15/A+16	A/A	A/A	A-2/A+10	A/A	A-4/A	A/A	A/A+4
あきづき	A+16/A+16	A/A	A/A	A-2/A	A/A	A/A	A/A	A/A
新高	A-6/A	A/A+8	A/A+10	A-2/A+10	A/A+6	A/A+2	A/A	A/A
ゴールド二十世紀	A-15/A+16	A/A	A/A	A-2/A+10	A/A	A-4/A	A/A	A/A+4
新興	A/A+16	A/A+8	A/A+10	A-2/A-2	A-2/A	A-4/A	A/A	A-2/A+4
長十郎	A-6/A+12	A/A	A/A	A/A+10	A-2/A	A/A+2	A/A	A/A+4
南水	A-6/A+16	A/A	A/A	A-2/A+10	A/A+6	A/A+2	A/A	A/A
新水	A-15/A+16	A-2/A	A/A	A-2/A	A/A+2	A-4/A+2	A/A	A/A+18
愛宕	A-6/A	A/A+8	A/A+11	A/A+10	A-2/A-2	A/A	A/A	A/A+4
王秋	A+12/A+16	A/A	A/A+4	A-2/A-2	A/A	A-4/A	A/A	A/A+4
なつしずく	A-15/A+12	A/A	A/A+11	A/A+10	A/A	A-4/A-4	A/A	A/A
備考	A=82	A=80	A=119	A=128	A=163	A=129	A=154	A=130

4-10. 実験操作フロー図



参考文献

1) Yamamoto, T., T. Kimura, Y. Sawamura, T. Manabe, K. Kotobuki, T. Hayashi, Y. Ban and N. Matsuta (2002) Simple sequence repeats for genetic analysis in pear. Euphytica 124: 129-137.

2) Yamamoto, T., T. Kimura, M. Shoda, Y. Ban, T. Hayashi and N. Matsuta (2002) Development of microsatellite markers in Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai). Molecular Ecology Notes 2: 14-16.

3) Yamamoto, T., T. Kimura, M. Shoda, T. Imai, T. Saito, Y. Sawamura, K. Kotobuki, T. Hayashi and N. Matsuta (2002) Genetic linkage maps constructed by using an interspecific cross between Japanese and European pears. Theoretical and Applied Genetics 106: 9-18.

4) Sawamura, Y., T. Saito, N. Takada, T. Yamamoto, T. Kimura, T. Hayashi and K. Kotobuki (2004) Identification of parentage of Japanese pear 'Housui'. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science 73: 511-518.

5) Kimura, T., Y. Z. Shi, M. Shoda, K. Kotobuki, N. Matsuta, T. Hayashi, Y. Ban and T Yamamoto (2002) Identification of Asian pear varieties by SSR analysis. Breeding Science 52: 115-121.

6) Kimura, T., Y. Sawamura, K. Kotobuki, N. Matsuta, T. Hayashi, Y. Ban and T. Yamamoto (2003) Parentage analysis in pear cultivars characterized by SSR markers. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science 72: 182-189.

7) Yamamoto, T., T. Kimura, T. Hayashi and Y. Ban (2006) DNA profiling of fresh and processed fruits in pear. Breeding Science 56: 165-171.

8) Yamamoto, T., T. Kimura, S. Terakami, C. Nishitani, Y. Sawamura, T. Saito, K. Kotobuki and T. Hayashi (2007) Integrated reference genetic linkage maps of pear based on SSR and AFLP markers. Breeding Science 57: 321-329.

サンプルの採取

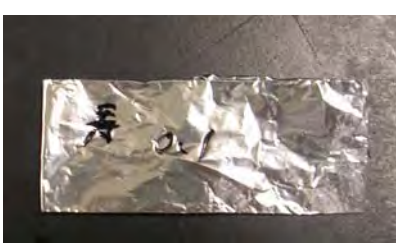
サンプルの準備（前日までにやっておく）

各個体の幼葉　0.1 g（DNeasy Plant Mini Kitを用いる方法）
　　1g（Genomic-tip 20/G＋G2バッファー法）

＊採取した時期によって、とれるDNAの質／量が異なるので注意する。
＊できるだけ若い未展開の葉を用いて、生葉、凍結乾燥葉、凍結保存葉を使用する。
＊完全展開葉、シリカゲルで乾燥させた葉、押し葉標本の葉では、
　うまくDNAが抽出できない場合があるので注意を要する。
＊生果実では、果皮を用いてDNA抽出を行う。
＊穂木では、十分に充実した穂木の花芽や葉芽からDNA抽出が可能である。
　1月以降にサンプリングした穂木の花芽や葉芽は、利用可能である。

1) 天秤で0.1g、もしくは1gを秤量する

2) ビニール袋やアルミホイルで包み、
　-80℃（20℃）で冷やしておく



準備するもの

マイクロピペット　1000µl用、200µl用、10µl用
マイクロピペット用チップ（滅菌済み）
1.5mlエッペンドルフチューブ
乳鉢、乳棒、スパーテル（感熱滅菌済み）
ディスポーザブル手袋
液体窒素

サンプルの粉砕方法手順

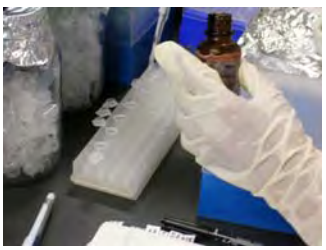
＊これからの作業は手袋をして行うこと

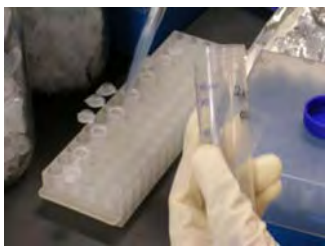
1) 1.5mlエッペンドルフチューブに、
450 µl のBuffer AP1と
8 µlのメルカプトエタノールを入れる。

⬇

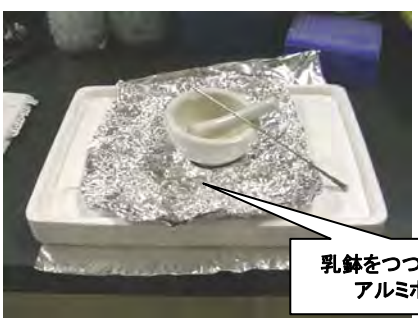
65℃に温めておく

※RNase 処理を行う場合は、4 µlのRNase A
(キットに添付のもの、100 mg/ml) を加える。





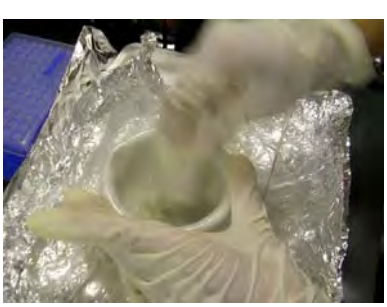
2) 乳鉢、乳棒、スパーテル各1つ
ずつをアルミホイルから出し、
写真の様に置く。



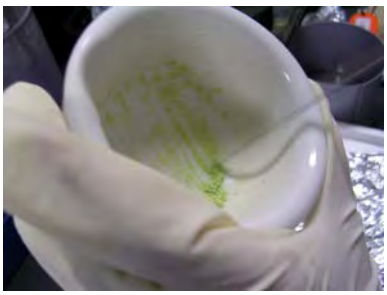
3) 乳鉢の1/3まで液体窒素を注ぎ入れ、
乳鉢、乳棒、スパーテルをよく冷やす。

4) 液体窒素がなくなる前に、
サンプル0.1gを乳鉢に入れる。

5) 液体窒素が揮発してなくなってから、
すばやく幼葉をすりつぶす。

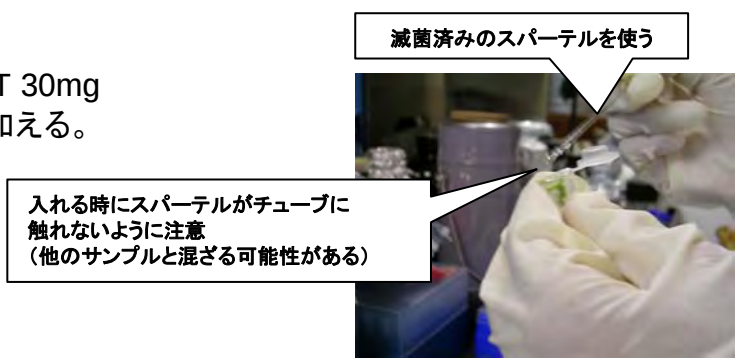


6) 幼葉が粉々になったら、
スパーテルで回収する。
（乳棒についたものもとる）



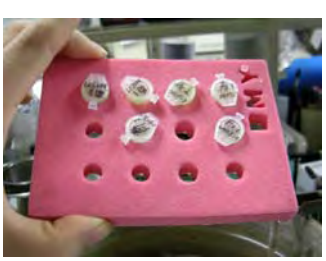
7) エッペンドルフチューブの
縁のこすりつけるようにして、
粉状の幼葉を入れる。

8) 必要に応じて、polyclar AT 30mg
（スパーテルで2杯分）を加える。



9) 軽くふって攪拌する。
チューブにサンプル名を
予め書き込んでおく。

10)フロートにチューブを差し込み、
ウォーターバスに浮かべ、
65℃で10 分間静置する。
途中で、2-3回上下反転混和する。
＊ブロックヒータでも可。



11) 150 µl のBuffer AP2を加え、軽く混合した後、氷上で5 分間静置する。

12) 冷却遠心機（TOMY社製MX-160、ローターTMA-24）で、14,000 rpm、10分間、15℃で遠心する。

13) 上記12)の遠心分離で得られた上清を、QIAshredder spin column（紫色）に加え、14,000 rpm、2分間、15℃で遠心する。

14) QIAshredder spin columnを通して得られた液に、800 µlのBuffer AP3/E（エタノール添加を確認）を加え、ピペッティングにより混合する。

15) 上記14)で得られた混合液のうち650 µlを、DNeasy Mini spin column（白色）に加える。

16) 12,000 rpm、1分間、15℃で遠心した後、溶出液を捨てる。

17)上記14)で得られた混合液の残りを、DNeasy Mini spin column（白色）に
加え、12,000 rpm、1分間、15℃で遠心した後、溶出液を捨てる。

18)DNeasy Mini spin columnを、新しいコレクションチューブ内に移し、
500 µlのBuffer AW（エタノール添加を確認）を加え、12,000 rpm、1分間、
15℃で遠心した後、溶出液を捨てる。

19)DNeasy Mini spin column に500 µlのBuffer AW（エタノール添加を確認）を
加え、12,000 rpm、1分間、15℃で遠心した後、溶出液を捨てる。

20)再度、12,000 rpm、1分間、15℃で遠心し、溶液を除去する。

21)DNeasy Mini spin columnを1.5 mlチューブに移す。

22)ウォーターバスで65℃に温めておいた100 µlの1/10 TEを加え、
5 分間静置した後、10,000 rpm、1分間、15℃で遠心し、DNA溶出液を得る。

23)再度、65℃に温めておいた100 µlの1/10 TEを、DNeasy Mini spin columnに
加え5 min静置した後、10,000 rpm、1分間、15℃で遠心し、DNA溶出液を得る。

Buffer AP2: Irritant (R36/38, S13-26-36-46). Buffer AP3/E: Harmful, Irritant (R22-36/38, S13-26-36-46). RNase A solution: Sensitizer (R42/43, S23-24-26-36/37)
Xn
QIAGEN Sciences, Maryland 20874, USA. Tel: 1-240-686-7700
DNeasy Mini spin column
QIAshredder spin column

DNAの定量－電気泳動によるDNAの確認－

電気泳動用のゲル（アガロースゲル）の作成

試薬の準備

1) 50×TAE (Tris-acetate, EDTA)・・・・ストック用

試薬	最終濃度	使用量
Tris	2M	242g
氷酢酸	2M	57.1ml
0.5M EDTA	0.05M	100ml
蒸留水	―	500ml
蒸留水（メスアップ用）	―	+α
計		1000ml

①蒸留水500mlにTris を加えて溶かし、
氷酢酸、EDTAを加える
↓
②1000mlに蒸留水でメスアップする。

2) 1×TAE(Tris-acetate, EDTA)・・・・泳動用buffer

試薬	使用量
50×TAE	200ml
蒸留水	＋α
計	10L

3) アガロース：電気泳動用　agarose S (ニッポンジーン)

4) 道具

・小型電気泳動システム（Mupid-2）
・200ml三角フラスコ
・サランラップ
・スターラー
・スターラーバー

Mupid-2　一式

ゲルの調整（1％，17穴ゲル2枚分）

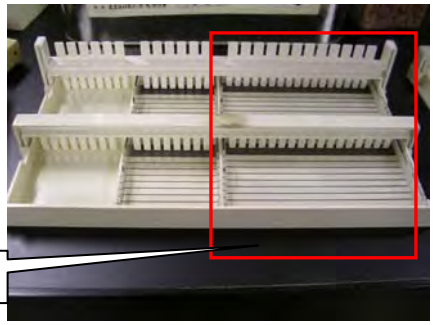
①アガロース 0.6gと1×TAE 60mlを
計り取り、200ml三角フラスコに、アガロース、TAEの順に加える。スターラーバーを入れてスターラーで攪拌する。
（アガロースの塊が無い状態に）

②ラップをする（密封しないように爪楊枝で穴をあける）

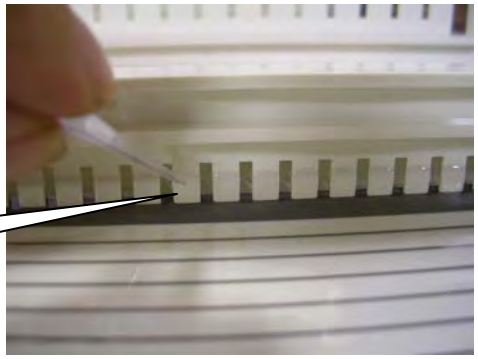
③電子レンジで40秒間加熱したあと、静かに揺り動かしながら攪拌する。
（このとき突沸しやすいのでやけどに気をつける）
取り出す時は熱いので軍手、眼鏡をすること。
アガロースが完全にとけ液が透明な状態になるまで、
これを繰り返す。（約40秒×2～3回程度）

④触れる程度（約50℃）になるまで、約30分間
スターラー上で攪拌しながら冷ます。

⑤④の間にゲルメーカー台にゲルメーカー板
（大－17穴用）とコームをセットする。



⑥2枚分に均等に分け、コームの間に
入った気泡をチップの先端などでつぶす。



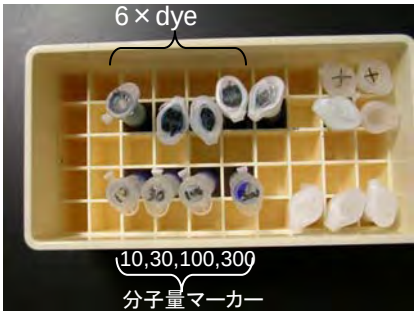
泡が入っているとゲル漏れ
などの原因になる

⑦ラップをかけてゲルが固まるまで
(約30分間)静置する。

⑧1×TAEをゲルの上にかけ、コームを静かに抜く。
抜く時はコームを垂直に持ち上げ、穴(ウェル)が
崩れないように気をつける。

※すぐ使わない時は乾燥を防ぐため、少量の1×TAEをゲル上にかけておく。
長期間使わない時はタッパーで1×TAEにゲルメーカー板ごと浸し、
冷蔵庫(4℃)にいれて保存する。(1ヶ月は保存可能)

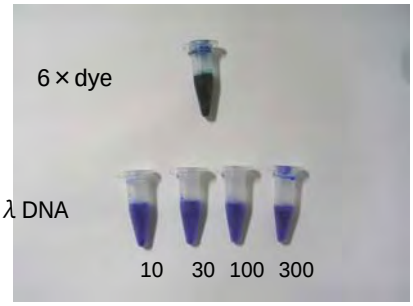
電気泳動



準備する試薬

- •抽出したDNAサンプル
- •6×dye (ゲルローディングバッファー)
- •サイズ確認用分子量マーカー
  (λDNA10, 30, 100, 300 ng/μl)
- •滅菌milliQ
- •エチジウムブロマイド溶液(原液100 μl/1L)
  1×TAEで希釈して、専用タッパーに入れておく。

※エチジウムブロマイドには発ガン性があるため、扱う時は必ず手袋、眼鏡を着用する。



エチジウムブロマイド溶液の調製法

1) 1×TAE　500ml をはかりとる。
2) エチジウムブロマイド原液(〇〇濃度、既製品、4℃)、マイクロピペットと200μl用フィルターチップ、廃棄するチップを入れるPPチューブを持って暗室に移動。

※このとき手袋、眼鏡を必ず着用する

3) タッパー中の古い溶液をエチジウムブロマイド廃液用バケツにすてる。
(廃液は後でアンチホルミンで処理し廃棄)
4) 1)のTAEをタッパーに移し、エチジウムブロマイド原液を50 μlを加えて、タッパーを静かに揺らして混ぜる。
5) 原液をはかりとるのに使ったフィルターチップをPPチューブに入れ、エチジウムブロマイド汚染物用ゴミ箱に捨てる。使用した手袋等もゴミ箱に捨てる。

道具

- •マイクロピペット(10μl、2μl用)
- •パラフィルム
- •チビタン(小型遠心分離機)
- •チップ(1-10μl用)

電気泳動の手順

①泳動層に1×TAEを入れ、その中に
作成したゲルをゲルメーカー板ごと沈め、
ゲル上面1cmくらいになるまでTAEを
追加する。

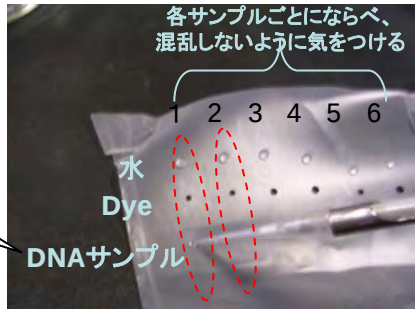
泳動方向

②DNAサンプルを指ではじいて
攪拌し、小型遠心分離機
（チビタン）で内面についた液を
底に集める（スピンダウン）。

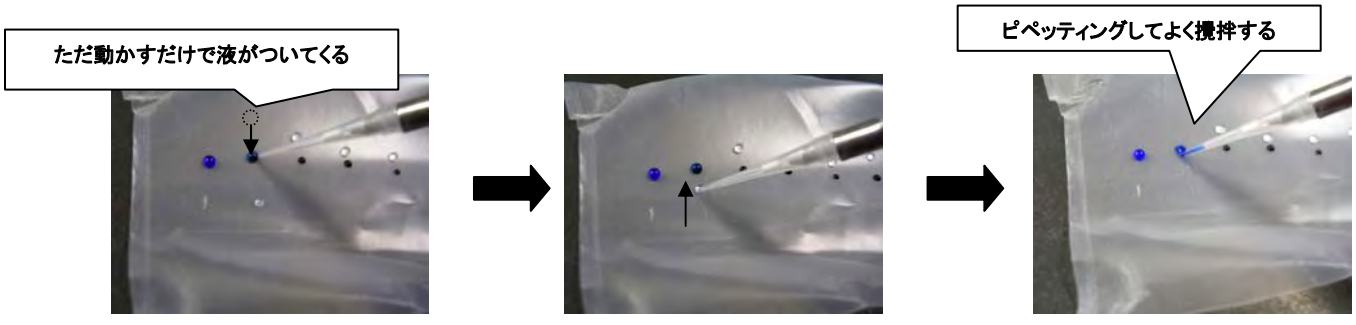
チビタン

③パラフィルム（10cm程度）を机に広げる。
（紙がついている方を上にする）

パラフィルム上に
・滅菌milliQ 6µl
・6×Dye 2µl
・DNAサンプル 2µl
の順に滴下する。



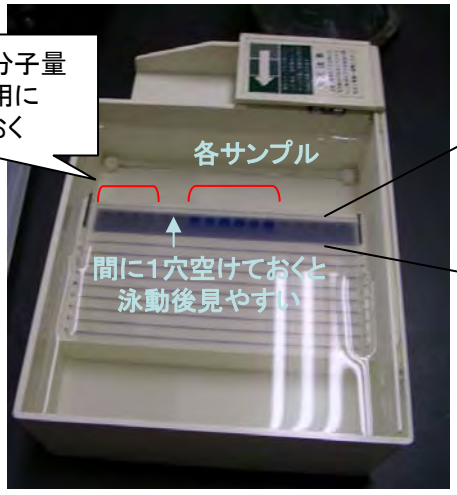
④ピペットの先で水、Dye、DNAサンプルを混ぜ合わせ、マイクロピペットの
ボタンを静か数回上下させ攪拌（ピペッティング）する。

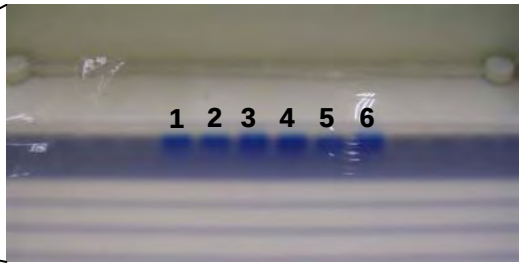


⑤④を10μlをとり、泳動層の穴（ウェル）に入れる（アプライする）。
全てのサンプルが終わったら、10, 30, 100, 300 ng/μlのλDNA分子量マーカー 10μlも同様にアプライする。

サンプルのアプライ

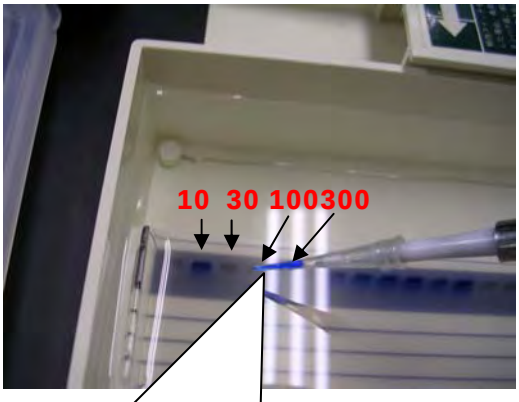
どのサンプルをどこのウェルに入れるかを
あらかじめ決めてノートなどに
記入しておくと間違えない





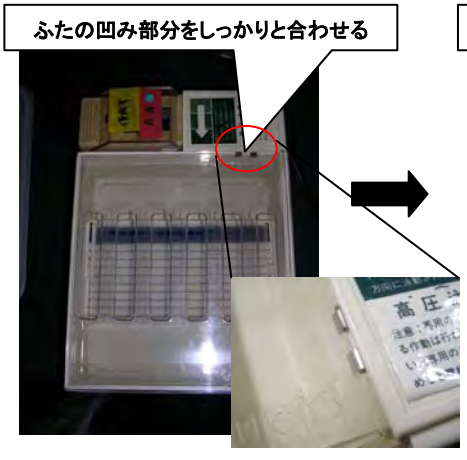
アプライするとき、ピペットの第2ストッパーまで
押すと、空気がでてバッファー内にアプライした
サンプルが散ってしまうことがあるので気をつける。

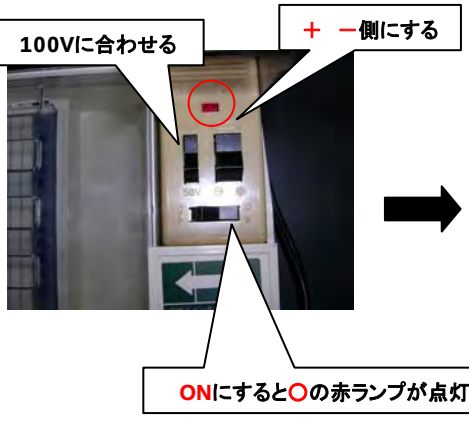
λDNA分子量マーカーのアプライ

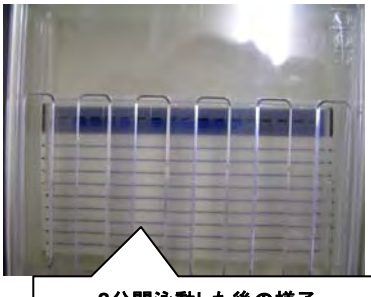


分子量マーカーには予めDyeが混合して
あるので、10μlアプライすればよい

⑥フタをセットし、電源コードを差し、
スイッチをオンにして泳動を開始する。
1～2分間そのまま様子をみて、泳動が
進んでいるか確認する。30分間程度泳動する。





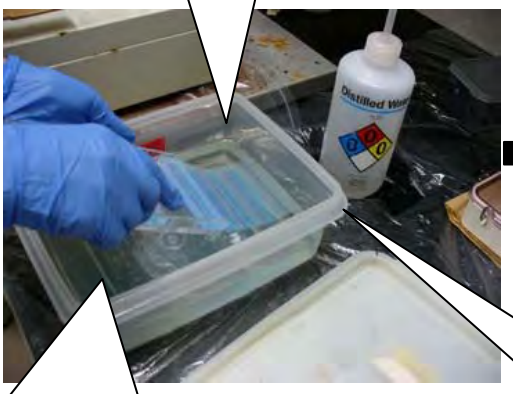


2分間泳動した後の様子
青いマーカーがウェルから
若干下に移動している

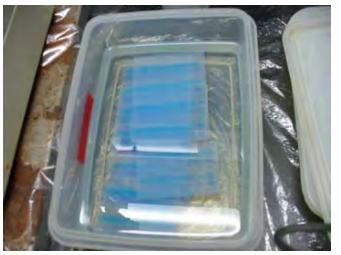
⑦泳動後、静かに泳動層からゲルをゲルメーカー板ごととりだし、静かにエチジウムブロマイド液中にゲルのみをすべりおとす。15分そのまま静置し染色する。
（エチジウムブロマイド液の濃度によって染色時間は変わるので様子を見ながら時間調節をする）
※エチジウムブロマイド液は発ガン性があるため、暗室内に入る時は必ず手袋、眼鏡を着用する。
また手袋は、暗室内のエチジウムブロマイド汚染物専用のゴミ箱に捨て、暗室外に持ち出さない。

泳動が終了したときの様子（泳動時間30分）

暗室内

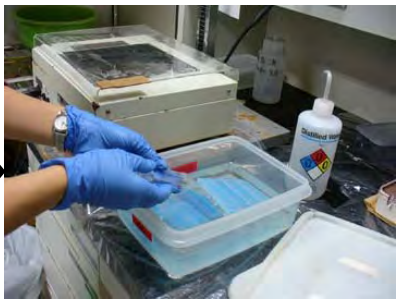


15分間染色

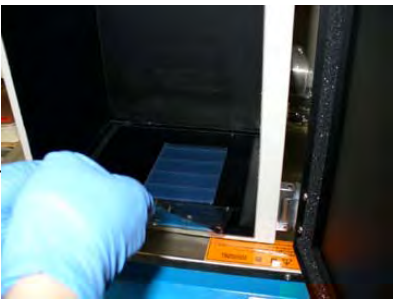


⑧液中からゆっくりとゲルをすくい上げ、トランスイルミネーター上にのせる。
（このときゲルを置く位置に気をつける）

トランスイルミネーター本体のスイッチを入れる

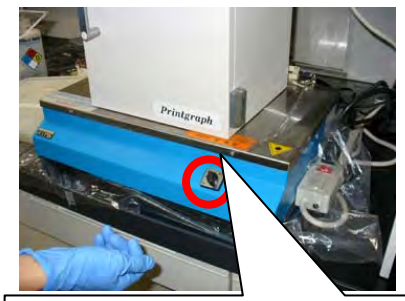


割らないように気をつけながらすくい上げよけいな液をきる



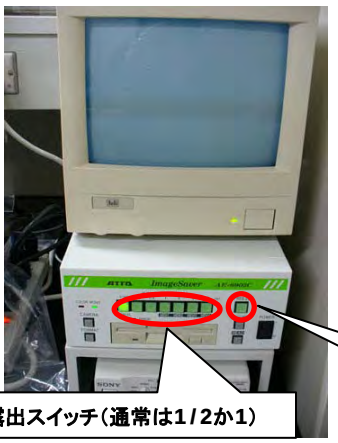
モニターをみながら、画面中央に来るようにイルミネーター上にゲルを配置

⑨ボックスの扉を閉じ、トランスイルミネーターのUVランプをオンにする。モニター画面を見ながら、露出などを調節し、見やすい状態になったら、写真を印刷する。



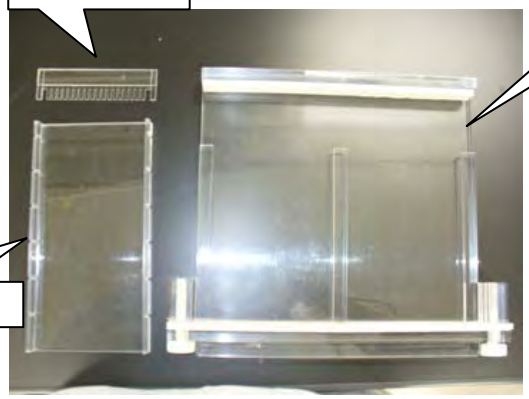
UVのスイッチをON（100%）にする

※UVは皮膚や目に害を与えるので、UV照射中はボックスの扉をあけない

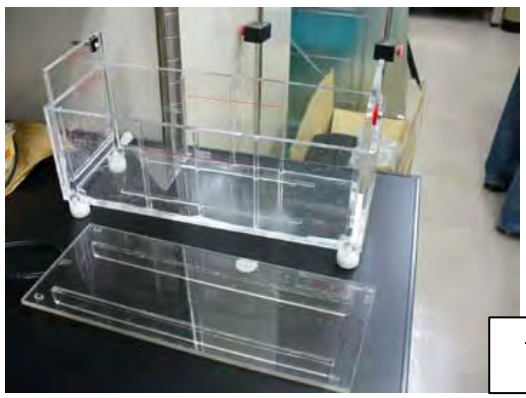


おまけ：96穴プレートの泳動方法

ゲル台
ゲル板
コーム（18穴）

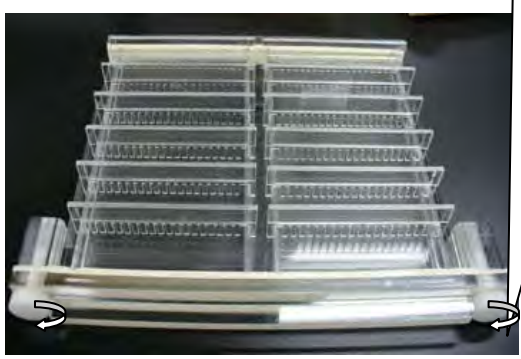


泳動装置



準備

ゲル板をゲル台の上にのせ、
ゲル台のねじを回してしっかりと固定する
↓
コーム（各１枚に6本）をさしておく



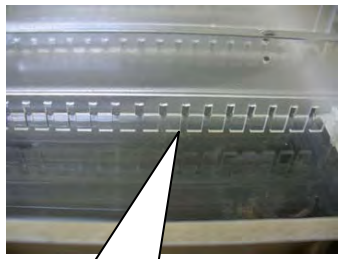
①ゲルを作成する

1.5%アガロースゲルを作成する

例）ゲル板2枚分

Agalose	3.0g
1×TAE	200ml

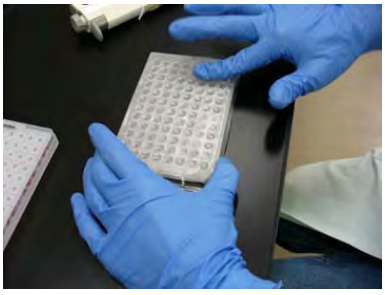
以上の材料を300ml三角フラスコにいれ、電子レンジで加熱して溶かす
↓
触れる程度までスターラーで攪拌するなどして冷ました後、ゲル板に流し込む
↓
30分程静置し固める



②アプライするサンプルをつくる

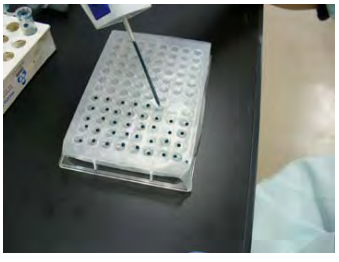
例）
2×dye　2μl
DNA　　2μl

パラフィルム上で混合する。
一度に96サンプルを調整する
ときは8連ピペットを用いて
調製すると短時間でできる。

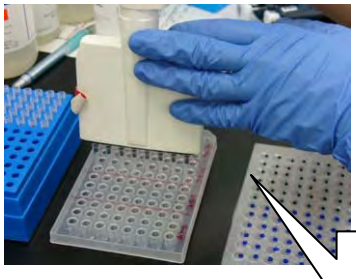


空の96穴プレートの上にパラ
フィルムをしき、軽く押さえる

ステッパーに0.1mlのチップ
をセットし、ダイヤルを
回して2μlにあわせる



パラフィルム上に2μlずつ
2×dyeを分注する

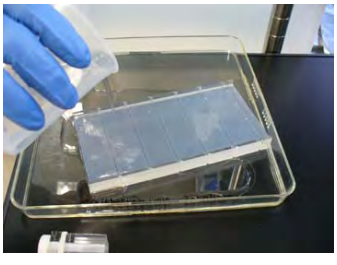


DNA2μlを
8連ピペットでとり

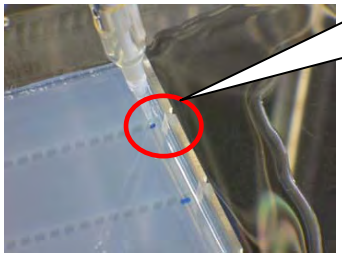
元のDNAサンプルと同じ位置にある2×dyeと混合すると間違えない

パラフィルム上の2×dyeと
ピペッティングで混合する

③ゲルにアプライする



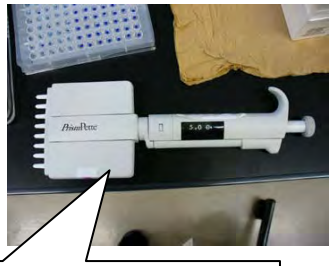
コームを抜いて、ゲル台からゲル板ごと
ゲルを外す。コームを抜いてできた
ウェル（穴）に1×TAEを注ぎ入れる



ゲル板ごとにマーカーを
アプライする位置を変える
↓
染色した後で混乱しない

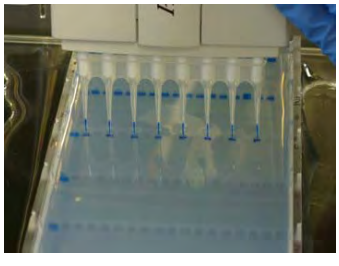
例）1-10kbマーカー
2μlアプライ

各段すべてにマーカーをアプライする
※DNAの濃度を測りたい場合にはλDNAマーカー
断片長の比較の場合には各種サイズマーカー



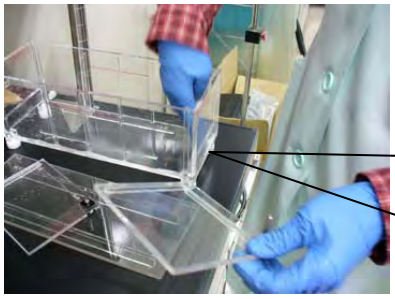
ゲルアプライ用の8連ピペット

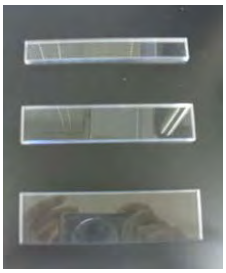
②で作成したサンプル全量をゲルアプライ
用のチップをつけた8連ピペットでとり



ゲルにアプライする

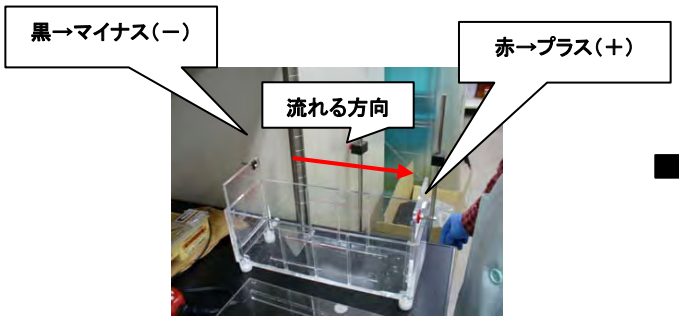
④泳動する　　50分間泳動する。一度に泳動する枚数などによって
泳動時間は変わるので様子をみながら調節する。

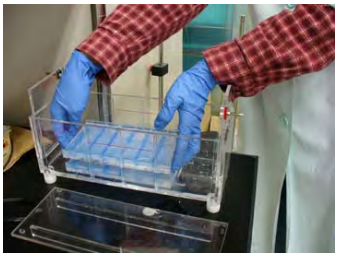




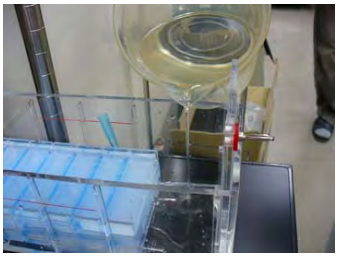
※1枚のときははさまない

電極板との間に、流すゲル板の枚数にあわせてプラスチック板をはさむ

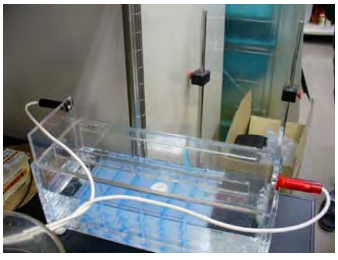




流れる方向にあわせて
ゲル板を泳動層にセットする



1×TAEをゲルの上まで
ゆっくり側面から注ぎ入れる
※勢いよく注ぐとアプライしたサンプルが
ウェルから浮き出るので注意



ふたをして電極板に
電極のジャックをさす

主電源を入れ、CVボタンを
押して調節つまみで
100Vにあわせる

※電源を入れている間は感電するおそれがあるので
バッファーなどにふれないように注意する

⑤エチジウムブロマイドで染色する
（手順は前ページ参照）

SSR解析用PCR

・10 X PCR buffer (-MgCl2)→-30℃に保管、一度解凍後は4℃で保存
・dNTP→-30℃に保管、一度解凍後は4℃で保存
・プライマー→-30℃に保管、使用後は再度-20℃にて保存
・MgCl2(塩化マグネシウム)50mM→-30℃に保管、一度解凍後は4℃にて保存
・Taqポリメラーゼ→-20℃で常に保存。使う直前に冷凍庫から出して使用。
　使用後は速やかに冷凍庫に戻す。
・鋳型DNA→4℃で保存
・滅菌MilliQ→常温で保存

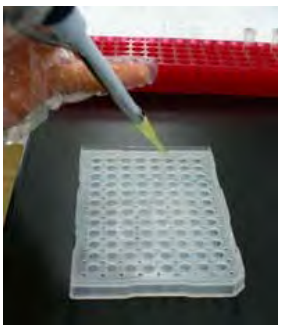
①反応液を調製する

以下の試薬のうち、DNA以外を、サンプル数に合わせて1.5mlエッペンドルフチューブで混合する

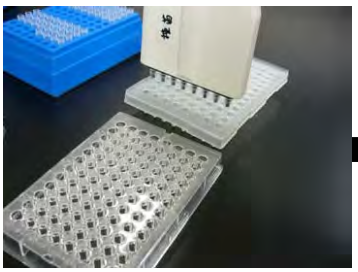
	X1(μl)	例)32サンプル ×36(μl)	例)96サンプル ×110(μl)
10XPCRbuffer (MgCl2 ぬき)	1	36.0	3960.0
dNTP(2mM)	1	36.0	3960.0
プライマー液(10pmol/ul each)	0.5	18.0	1980.0
$MgCl_2$(50mM)	0.4	14.4	1584.0
Taq ポリメラーゼ	0.05	1.8	198.0
鋳型DNA(2.5ug/ul)	1		
滅菌milliQ	6.05	217.8	23958.0
total	10	324	35640

実際のサンプル数よりも多めに調製する

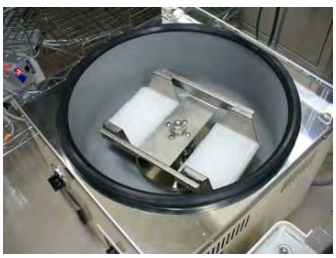
プライマーやDNAは使用前に指ではじいて混ぜ、遠心機で液を下に落とす。これらの試薬を混ぜるときは、コンタミをさけるためにフィルターチップを使用すること



混合した反応液をPCR用リアクションプレートに分注
例)→各サンプル9μl分注

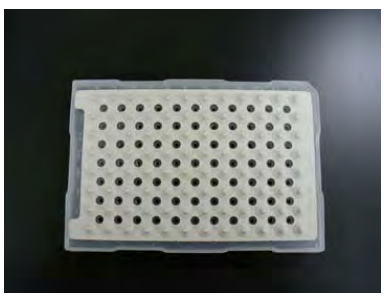


分注した反応液に鋳型DNA1μl
8連ピペットを使って分注する



遠心機でスピンダウンして液を下に落とす

②PCR反応する



リアクションプレートに
PCR用のふたをする
(プレートにサンプル名や日付などを書く)

サーマルサイクラーにセットし、本体の蓋をしめ、PCR反応を行う

〈 Program 〉
user →yama or yam→accept
→run→52c35→start→
volume→10μl

反応時間
約3時間30分

当日中にフラグメント解析をしない場合は
-30℃で保存する

シーケンサーによるフラグメント解析

PCR産物の希釈（×10希釈）

1. マイクロタイタプレートに8連ピペットを使って1/10TEを27μlずつ分注する。
2. 各PCR産物を3μlずつ分注する。

→すぐに使用しないときは4℃または-20℃で保存

3100シーケンサーによるフラグメント解析用サンプルの調製

1. 96-Well Reaction Plate (ABI社) もしくは384-Well Reaction Plate (ABI社) に、Hi-Di Formamide + 400HD[ROX]混合液 8.5 μlを分注する。

2. 希釈したPCR産物を1.5μlずつ分注する。

3. 遠心器でスピンダウンする。

4. キャップをし、サーマルサイクラーで95℃で5分間加熱（プログラム〈94c〉)する。 PCR装置のカバーはしない。

5. 5分間以上氷上におく。

6. 遠心器でスピンダウンする。

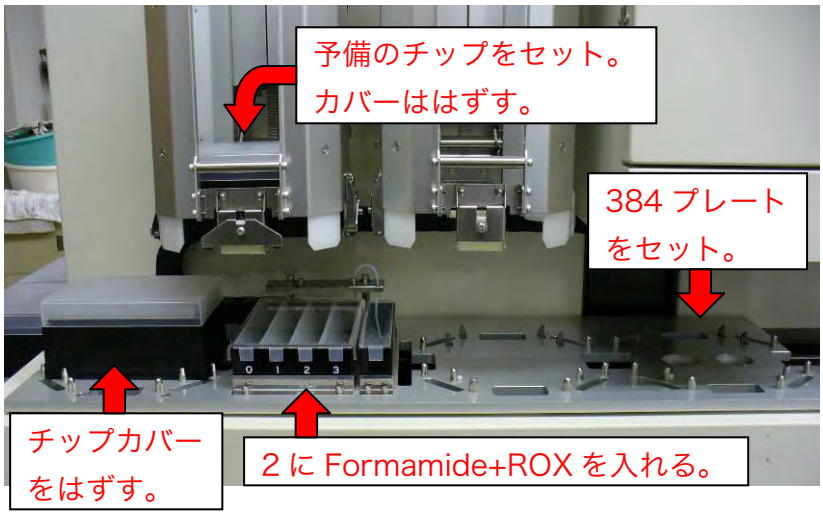
7. プレートアッセンブリをセットする。

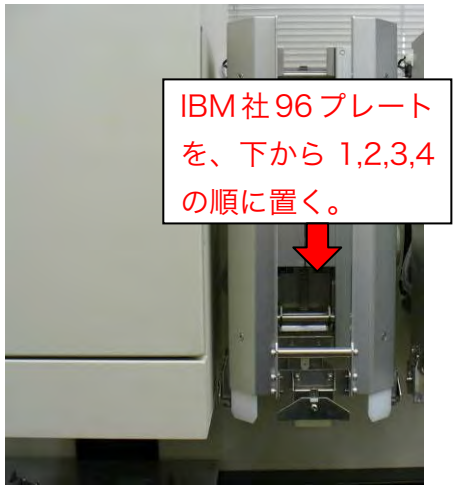
※ Hi-Di Formamide + 400HD[ROX]のストック

	X1プレート	X2プレート	X3プレート	X4プレート
HiDiホルムアミド	960	1920	2880	3840
400HD ROX	20	40	60	80
total(μl)	980	1960	3920	7840

自動分注器の使い方

1. 以下のようにセット。

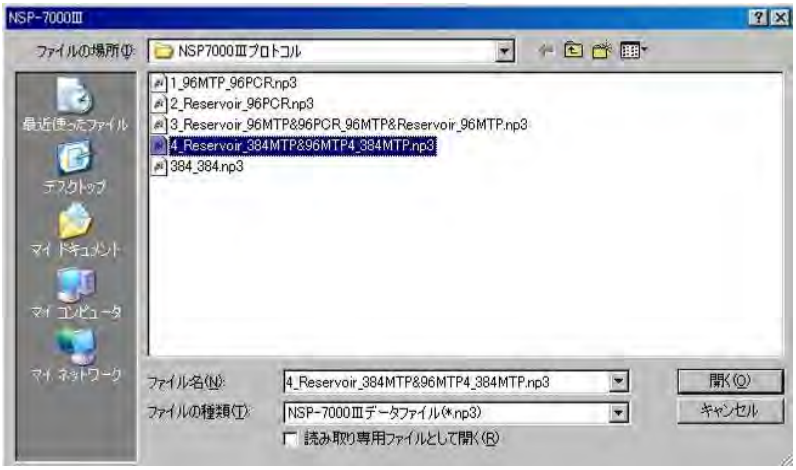




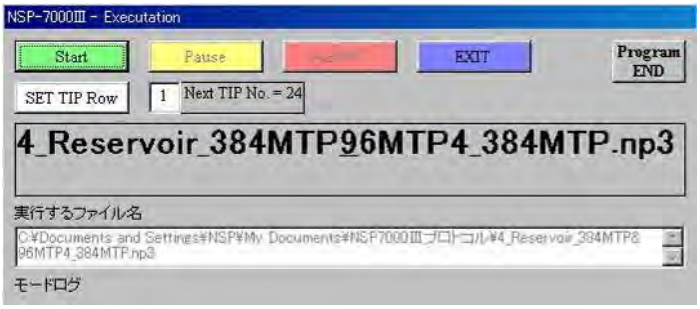
2. パソコンの電源を入れる。自動分注器の電源を入れ、NSPIII を起動。

3. ファイル→開く

C:\Documents and Settings\NSP\My Documents\NSP7000III プロトコル



4. 実行→ファイルを実行→Start



5. Program END で終了。

サンプルの調整

1. 96-Well Reaction Plate (ABI 社) もしくは 384-Well Reaction Plat (ABI 社) に、

希釈済みサンプル	1.5 µl
Hi-Di Formamide + 400HD[ROX]	8.5 µl

   を分注する。

2. 遠心器でスピンダウンする。
3. キャップをし、95℃で 5 分間加熱する。PCR 装置のカバーはしない。
4. 5 分間以上氷上におく。
5. 遠心器でスピンダウンする。
6. プレートアッセンブリをセットする。

※ Hi-Di Formamide + 400HD[ROX]のストック

96 プレート	Hi-Di Formamide	400HD[ROX]
1 枚	940 µl	20 µl
2 枚	1880 µl	40 µl
3 枚	2820 µl	60 µl
4 枚	3760 µl	80 µl

-20℃で凍結保存。長期保存は不可。

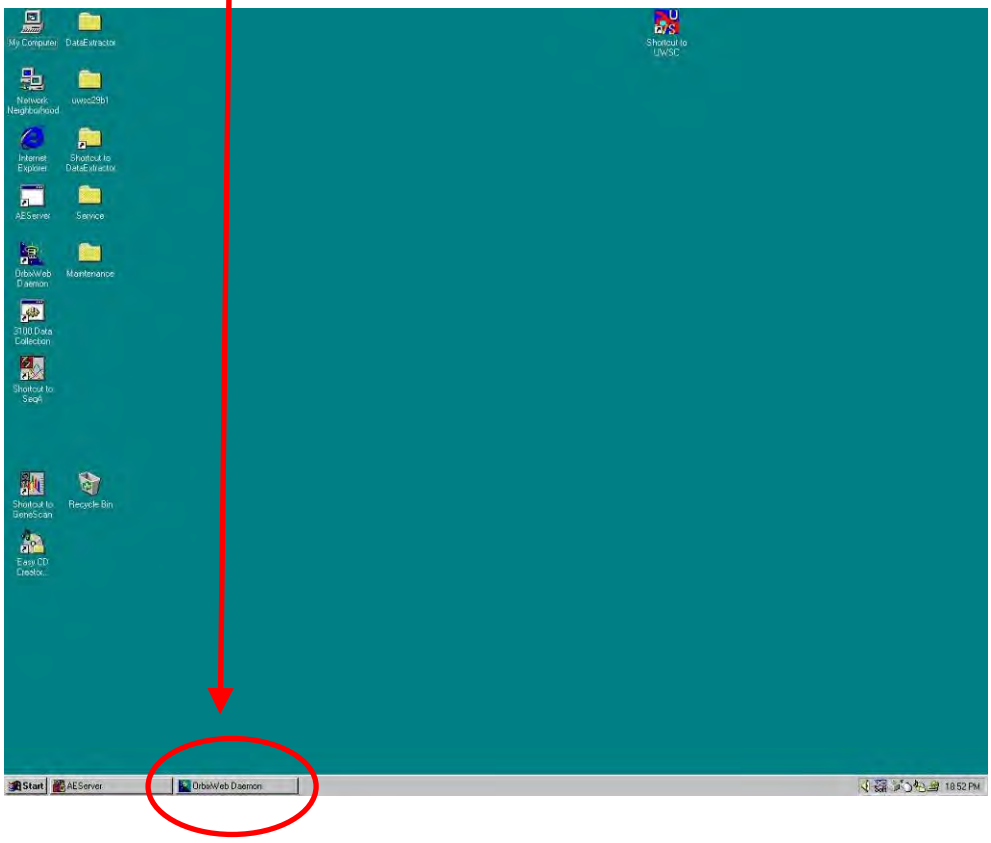
3100 Data Collection の起動

1. コンピュータの電源を入れ、Windows NT にログオン（Ctrl+Alt+Del）する。

   User Name：3100user、Password：なし

2. タスクバーに、OrbixWeb Daemon が起動していることを確認する。

   起動していない場合は、Start menu→Applied Biosystems→OrbixWeb Daemon

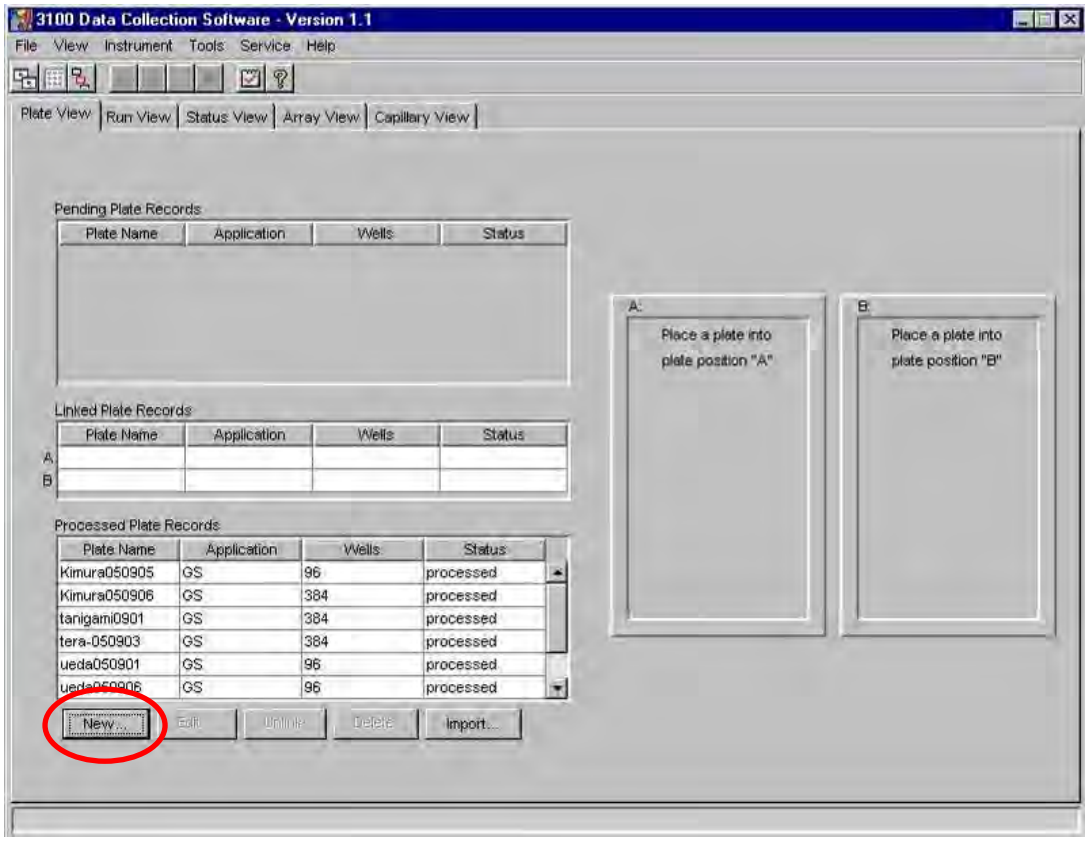


3. 3100 の電源を入れ、緑のステータスランプが点灯するまで待つ。

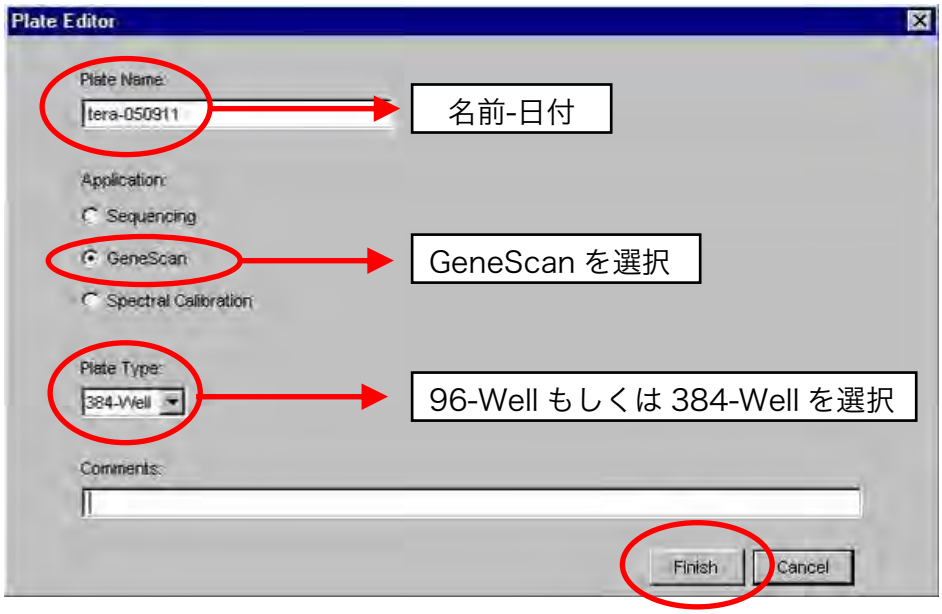
4. 3100 Data Collection を起動する。

Plate Record の作製

1. 左下の New ボタンを押し、Plate Editor ダイアログを表示する。



2. Plate Name を入力し、GeneScan をチェックする。Plate Type は、96-Well もしくは 384-Well を選択。必要があれば、Comments を入力。

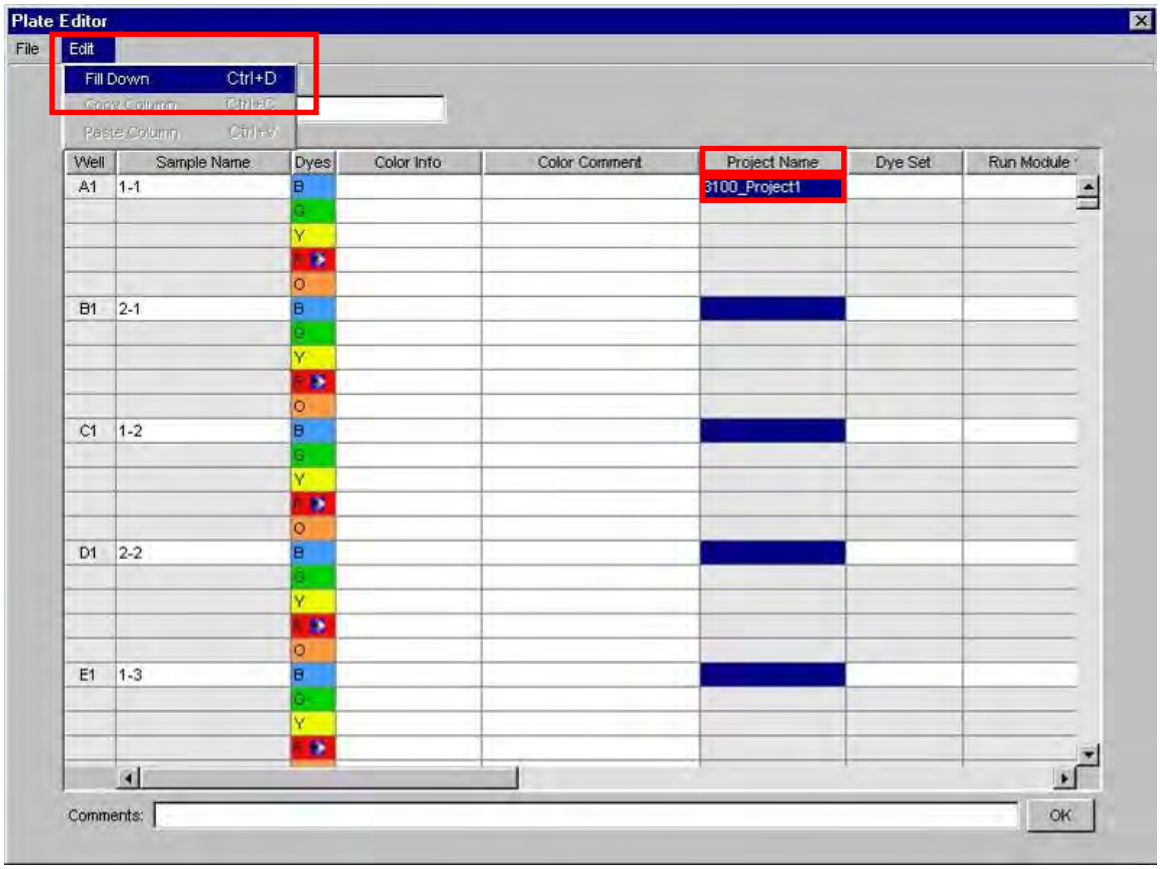


3. Finish ボタンをクリックし、Plate Editor ダイアログを開く。

4. Sample Name にサンプルの名前を入力する。

5. Project Name 下のカラムをクリックし、3100_Project1 を選択。

   Project Name をクリックし、Edit → Fill Down。



6. 同様に次の項目を設定。

   Dye Set： D

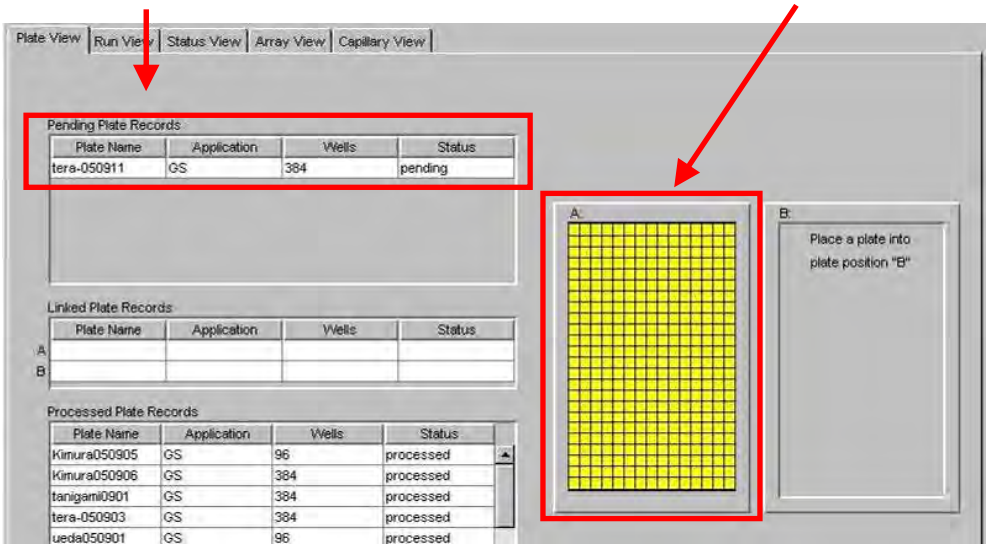
   Run Module1： GeneScan36_POP4_short

   Analysis Module1： GS400HDAnalysis.gsp

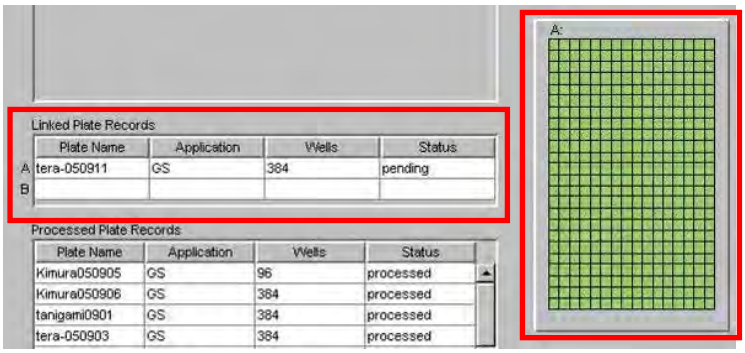
7. OK ボタンをクリックし、Pending Plate Records に Plate Record が加わっているか確認。

Plate の設置と Run スタート

1. Tray ボタンを押し、オートサンプラーが手前に出てくるのを待つ。
2. 扉を開け、A1 の位置が奥になるように Plate を設置。
3. Buffer と MilliQ 水を交換する。
4. Plate Record をクリックし、対応する黄色い Plate Position Indicator をクリック。



5. Linked Plate Records に Plate Record が移動し、Plate Position Indicator が緑色になるのを確認。



6. Run View タブをクリックし、Run I.D.とサンプルの位置を確認。
7. States View タブをクリックし Status 画面に切り替え、Run ボタンを押す。
8. 1 Run（16 サンプル）は、約 40 分。

   ※ GeneScan36_POP4_short の場合

9. Run 終了後は以下のパスにデータが保存される。

   D:\Appliedbio\3100\DataExtractor\Extracted Runs\

ポリマーの交換

1. コンピュータの電源を入れ、Windows NT にログオン（Ctrl+Alt+Del）する。

   User Name：3100user、Password：なし

2. タスクバーで、OrbixWeb Daemon が起動していることを確認する。

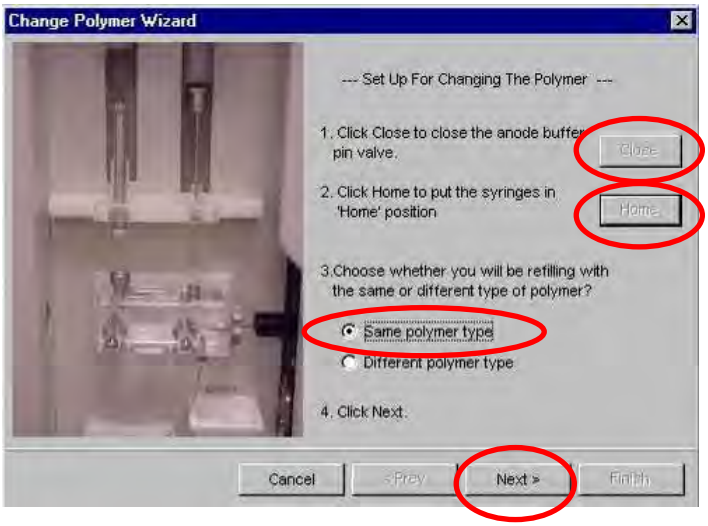
   起動していない場合は、Start menu→Applied Biosystems→OrbixWeb Daemon

3. 3100 の電源を入れ、緑のステータスランプが点灯するまで待つ。

4. 3100 Data Collection を起動する。

5. Tools→Change Polymer Wizard を選択。

6. Close→Home→Some polymer type→Nect の順にクリック


Change Polymer Wizard
--- Set Up For Changing The Polymer ---
1. Click Close to close the anode buffer pin valve.
Close
2. Click Home to put the syringes in 'Home' position
Home
3.Choose whether you will be refilling with the same or different type of polymer?
Same polymer type
Different polymer type
4. Click Next.
Cancel
< Prev
Next >
Finish

① Close

② Home

③ Some polymer type
   Ex) Some：POP4→POP4
   Ex) Different：POP4→POP6

④ Next

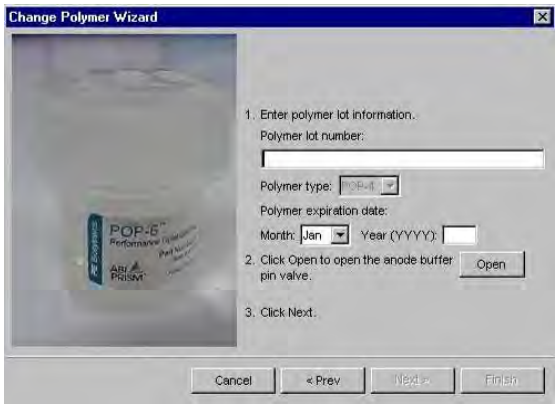
7. Tray ボタンを押し、オートサンプラーが手前に出て来たら扉を開ける。

8. シリンジガードを取り外し、ポリマーの交換。

9. シリンジと、シリンジガードを取り付ける。

10. Change Polymer Wizard の画面に戻り、Next をクリックし、扉を閉める。

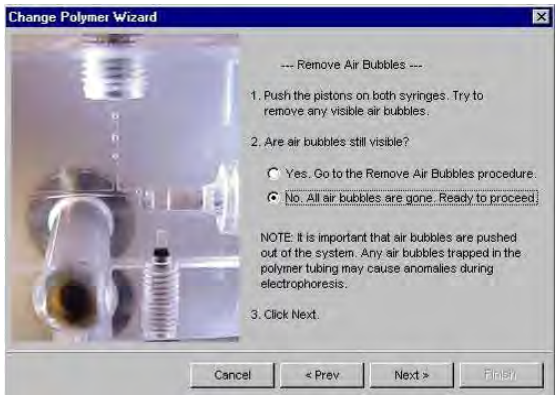
11. Polymer lot number 等を入力し、Open→Next の順にクリック。



12. Polymer lot 等を入力。

Change Polymer Wizard
1. Choose whether you will be using a different lot of polymer or the same lot of polymer.
Different lot of polymer
Same lot of polymer
2. Push down the array-fill syringe manually to remove the old polymer.
3. Click Next.
Cancel
« Prev
Next »
Finish

13. Tray ボタンを押し、扉を開け、気泡を抜く。Next をクリック。


Change Polymer Wizard
--- Remove Air Bubbles ---
1. Push the pistons on both syringes. Try to remove any visible air bubbles.
2. Are air bubbles still visible?
Yes. Go to the Remove Air Bubbles procedure.
No. All air bubbles are gone. Ready to proceed.
NOTE: It is important that air bubbles are pushed out of the system. Any air bubbles trapped in the polymer tubing may cause anomalies during electrophoresis.
3. Click Next.
Cancel
« Prev
Next »
Finish

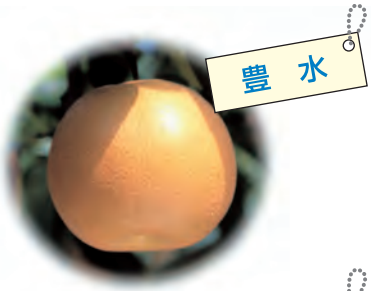
14. Buffer と MilliQ 水を交換し、Finish をクリック。

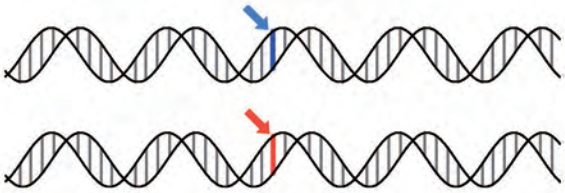
参考資料　その2

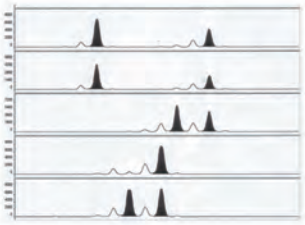
DNAマーカーによる果樹・果実品種判別

果樹研究所果樹ゲノム研究チーム

DNAマーカーによる果樹・果実の品種判別







独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構
果 樹 研 究 所

はじめに

果樹研究所は、明治35（1902）年に創設されてから100年余の間、我が国の果樹・果物の専門研究機関として、リンゴ「ふじ」、カンキツ「興津早生」、「清見」、ナシ「幸水」、「豊水」、モモ「あかつき」、クリ「筑波」、「丹沢」など多くの新品種を育成して我が国の果樹産業の発展を支えてきました。

くだものの品種名、原材料や原産地の表示など消費者サイドに立った食の安全・安心を確保する観点から、また、海外からの海賊版品種流入や産地詐称等の偽装表示の抑止など生産者や果樹産業を支えるために、育成品種や国内外の品種を科学的な手法により判別する技術の開発が必要とされてきました。しかし、果樹類の果実は、生食用のほかに加工用果実として利用されるために果実形態での識別が困難な場合が多く、果樹生産や販売、研究に従事する専門職でも品種判別は困難です。 さらに、乾燥果実（各種ドライフルーツ）や缶詰、シロップ浸け、甘露煮、ジュース、チップス（リンゴチップス、バナナチップス）、ジャム、塩漬け（梅干し）、果実酒（ワイン）など多種多様な加工品の場合、外観からの品種同定は不可能といえます。

果樹研究所ではこのような社会的要請を請け、各種DNAマーカーの開発、遺伝子地図の作成、データベースやコンピュータソフトウエアの開発などゲノム解析研究を進めてきました。これらの研究成果を利用して、大学や公立研究機関と協力してDNA品種判別の研究を進めてきました。現在までに、カンキツ類、ナシ、モモ、リンゴ、オウトウ、スモモ、ウメ、アンズ、ビワ、クリなど主要果樹でDNA品種判別技術を確立することができました。 さらに、生果実に加えて果実加工品からのDNA抽出とDNA鑑定を進めてきた結果、生果実に加え一部の果実加工品のDNA鑑定にも成功しています。

本パンフレットでは、これらの成果をわかりやすくまとめましたが、今後加工原料品種の偽装表示や原産国の偽装の抑止とともに、くだものの消費拡大の一助になればと考えます。

DNAマーカーとは？

品種間でのDNA塩基配列の違いを識別するための、ゲノム上の標識（目印）のことです。染色体上の遺伝子内あるいはその近傍の塩基配列の違いを識別して、DNAマーカーとして利用します。DNAマーカーによって、特定の遺伝子を含む染色体のある領域が親から子へ受け継がれたかどうか調べることができます。これらを用いて、品種・個人の識別や親子の判定を行うことをDNA鑑定といいます。ヒトでは、約10年ほど前から、DNA鑑定が裁判の証拠や犯罪捜査に広く使われています。植物分野でも、コメ、イグサ、イチゴ、インゲンマメなどでDNA鑑定が利用されています。

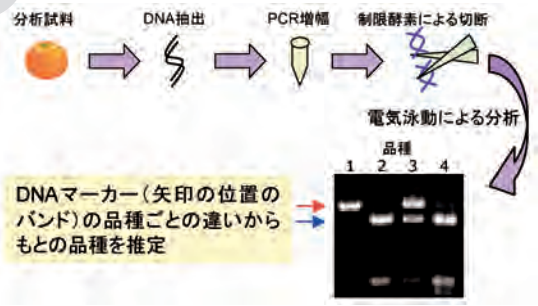
》》》DNA分析のしくみ

DNA（デオキシリボ核酸）は、核の中の染色体と呼ばれる物質のことです。植物や動物では、A（アデニン）、G（グアニン）、T（チミン）、C（シトシン）の４種類の塩基の暗号によって、数万種類もの遺伝情報が書き込まれています。 DNAは比較的安定な化学物質であり、生果実だけでなく、その加工品からもDNAを抽出することができます。 品種が近縁であれば配列もよく似ており、逆に遠縁になるほど配列に違いが見つかる可能性も高くなります。

DNA分析では、遺伝子を増幅する方法（PCR法）を利用して数百から数千塩基の配列を数千～数万倍に増幅し、下記のようなさまざまな方法で分析することで、果実だけでなく、加工品についても品種や混合割合などを調べることができます。

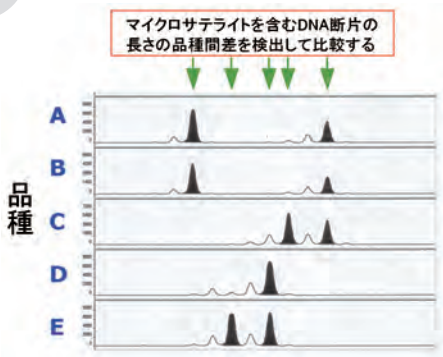
下記に、代表的な３種類のDNA分析法を紹介します。

1 CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) 法



CAPS法は、対象とする遺伝子領域をPCR法で増幅した後、制限酵素で特定の塩基配列を切断して長さの違いを検出する方法です。PCR-RFLP法とも呼ばれます。塩基配列情報が必要ですが、比較的簡単な操作で正確な結果が得られます。

2 SSR (Simple Sequence Repeat) 法

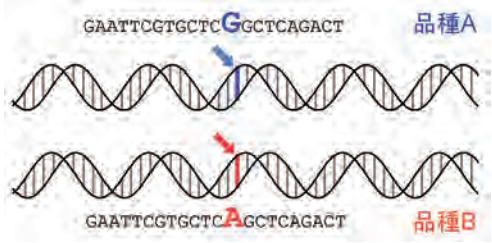


マイクロサテライトと呼ばれる数塩基の繰り返し配列（SSR）を利用して、PCR法で増幅したDNA断片の長さの差異を検出します。繰り返し配列領域は、突然変異を起こしやすいことから、 DNA断片の長さを高精度で分析することにより、近縁な品種同士でも判別が可能です。

品種A: GAGAGAGAGAGAGA
品種B: GAGAGAGAGA------
品種C: GAGAGA----------

SSRによる判別の例
GAの繰り返し回数の差
＝長さの違いを見わける

3 SNP (Single Nucleotide Polymorphism) 法



DNAの塩基配列を品種どうしでくらべると１塩基程度の違いがあちこちに見つかります。 これらはSNPと呼ばれ、この違いを利用することで品種を識別する方法がSNP法です。 現時点ではまだ高度な技術と分析コストが必要ですが、CAPS法やSSR法がDNAの長さを比較するのにくらべ特定の塩基の違いを直接見分けるために信頼性の高い分析が可能で、今後分解の進んだ試料や近縁な品種の識別に最も期待される方法です。

現在、下記のような様々な樹種で、品種判別が可能となっています。

樹種名	マーカータイプ	判別可能な主要品種名
モ　モ	SSR	白鳳、あかつき、川中島白桃、日川白鳳、清水白桃など約 50 品種
ナ　シ	SSR	幸水、豊水、二十世紀、新高、長十郎、あきづきなど約 100 品種
リ ン ゴ	SSR	ふじ、つがる、王林、ジョナゴールド、千秋、陸奥など約 80 品種
オウトウ	SSR	佐藤錦、ナポレオン、高砂、紅秀峰、紅さやかなど約 100 品種
ス モ モ	SSR	大石早生、ソルダム、太陽など約 120 品種
ウ　メ	SSR	南高、白加賀、豊後、小梅など約 40 品種
ア ン ズ	SSR	信州大実、ハーコット、アーリーオレンジなど約 20 品種
ビ　ワ	SSR	茂木、田中、長崎早生、楠、大房、房姫など約 30 品種
カンキツ	CAPS, SNP	ウンシュウミカン、スィートオレンジ、清見、はるみ、ポンカン、不知火など 40 品種以上

さまざまな樹種において科学的に品種を判別できるようになったことで、

- 果樹の品種名の確認や不当表示の抑制
- 外国からの果実の不法輸入の防止
- 品種登録や権利侵害でのトラブルの解決

が可能となっています。

品種判別技術が不正防止に役立った例

サクランボの紅秀峰、無断持ち出し
ー豪の生産者ら告訴へー

豪流出の山形高級サクランボ「紅秀峰」
中国にも不正流出か？

～DNA 分析による「おうとう」品種の識別～
（山形県農業総合研究センター農業生産技術試験場でマニュアルを作成）

農林水産省品種登録ホームページで情報公開中
http://www.hinsyu.maff.go.jp/

果実加工品を対象とする場合、加工の過程で DNA が分解されてしまい、従来の方法では安定した分析結果を得ることは困難です。そこで、さまざまな加工品からの DNA 抽出法と、分解の進んだ DNA でも安定した品種判別が可能な分析法を開発しました。

果実や加工品からの DNA 抽出

分析材料から抽出される DNA の分解程度の違い

ナシ果実を用いた DNA 鑑定

ナシ果実から DNA 鑑定に利用できる DNA の抽出方法を確立しました。 DNA マーカーデータベースと組み合わせることにより、果実の品種同定が可能です。

ナシ果実加工品の DNA 鑑定

乾燥果実から得られた DNA は部分的に分解されていますが、DNA 鑑定が可能です。缶詰果実やジュースからの DNA は低分子にまで分解されていますが、そのようなサンプルでも、それに合わせた SSR マーカーを設計することで、DNA 鑑定が可能となりつつあります。

ナシにおける DNA 鑑定結果

材　　料	DNA 鑑定
無 果 実	◎
乾燥果実	◎
缶詰果実	△
ジュース	△

カンキツ果実・加工品の DNA 鑑定

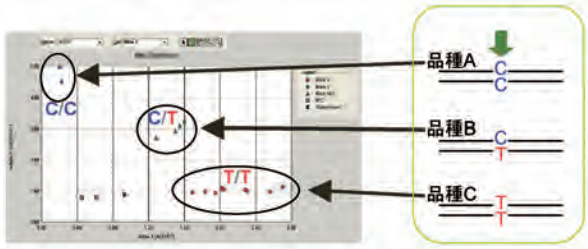
カンキツ果実から抽出した DNA を用いて分析を行い、DNA マーカーデータベースと組み合わせることで果実の品種同定が可能です。

果汁や果皮などのカンキツ果実加工品から抽出される DNA は分解が進んでいるため、長さを利用した分析方法で品種を識別することは困難です。そこで、１塩基の違いを見分けることのできる SNP マーカーを新たに開発しました。この方法を使うことで、品種判別の信頼性が飛躍的に向上しました。

カンキツ果実･加工品からのDNA抽出

分解の進んだ DNA でも分析可能な判定法を開発しました

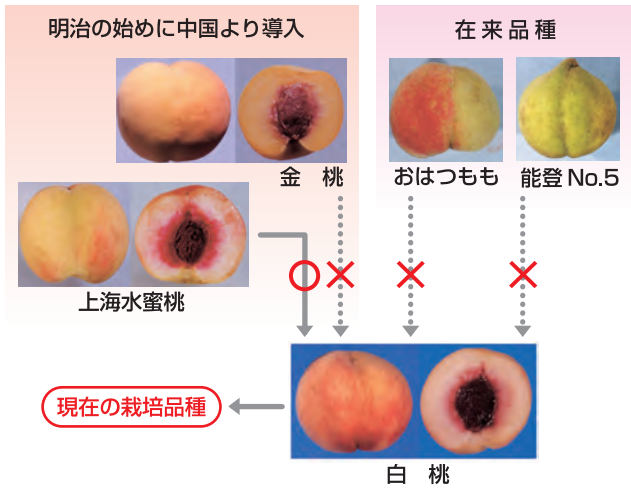
１塩基の違いを見分ける高感度な方法を使い、分析結果の座標位置（DNA マーカー）から遺伝子型を検出して品種を推定することができます。



日本の栽培モモの由来

現在の生食用モモ品種のほとんどは、「白桃」の子もしくは「白桃」の血を引いていますが、「白桃」自身の親は不明でした。 SSR マーカーによる分析の結果、「上海水蜜桃」が現在の生食用モモの起源品種であることが分かりました。

品 種 名	交雑親あるいは原品種	分 析 結 果
白　　鳳	白桃×橘早生	親子である
あかつき	白桃×白鳳	親子である
長沢白鳳	白鳳	枝変わりの可能性大
日川白鳳	白鳳	枝変わりでない

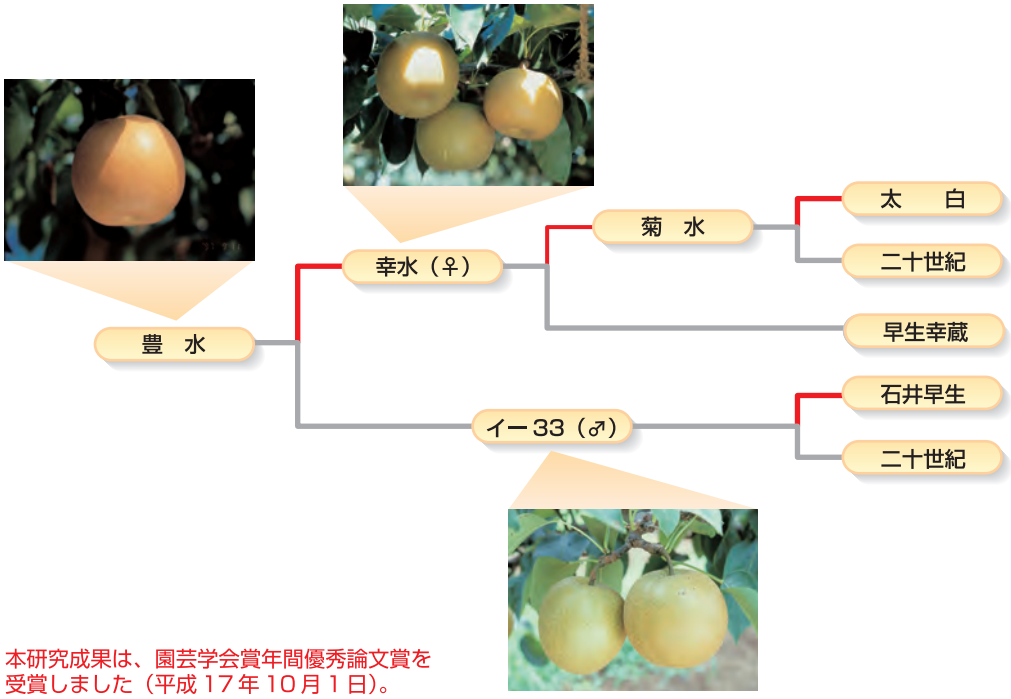


ナシ育成品種の親子鑑定

品 種 名	交雑親あるいは原品種	分 析 結 果
幸　水	菊水×早生幸蔵	親子である
新世紀	二十世紀×長十郎	親子である
豊　水	リー 14 ×八雲	両方とも親でない
大原紅	晩三吉× マックスレッド･バートレット	晩三吉は親でない マックスレッド･バートレットは親である

鑑定した 14 の親子品種のうち、4 品種は親子でないことが判明しました。

DNA マーカーで明らかになった「豊水」の育成系譜



本研究成果は、園芸学会賞年間優秀論文賞を受賞しました（平成 17 年 10 月 1 日）。

DNA マーカーを用いて品種判別を行うには、既存の品種に関するデータの蓄積が不可欠です。これまでに、カンキツやナシなどの DNA マーカー型をデータベース化しています。

カンキツ品種の DNA マーカーデータベース

DNA マーカー（矢印の一のバンド）の品種ごとの違いから品種を推定

電気泳道による分析

育成 18 品種の 81 のマーカー型をデータベース化

品種/マーカー	AI304	Ov118	Ov401	LP024	Mf033
不知火	bb	aa	aa	ab	bb
はるみ	bb	aa	bb	aa	bb
清　見	ab	ab	ab	ab	ab
せとか	aa	bb	bb	aa	ab

ナシ品種の DNA マーカーデータベース

ナシ品種同定の基盤となる DNA マーカーデータベースを作成中です。ナシで開発した SSR マーカーや遺伝子地図の情報、さらにニホンナシ等 96 品種の SSR 遺伝子型、自家不和合性遺伝子型、来歴、有用形質を網羅したデータベースで、完成後はナシの日本（世界）標準データベースとして公開していく予定です。

分析支援プログラムの開発

これまでに多数の品種について多くの DNA マーカー情報がデータベース化されています。しかし品種判別を行う場合、品種と DNA マーカーの組み合わせは莫大な数になります。そこで、特定の品種を判別するための最少限のマーカーセットを選ぶプログラム ”MinimalMarker” を開発しました。 これにより、分析精度を確保しつつ、時間とコストを抑えることが可能になります。

8 つの DNA マーカーを 9 品種に適用した例

マーカー	品種 V01	V02	V03	V04	V05	V06	V07	V08	V09
MO1	AA	AB	BB	AA	AB	AB	AA	AB	BB
MO2	AA	AA	AA	AA	BB	AA	AA	AA	AA
MO3	AB	AA	BC	AB	AC	AA	AB	BC	AA
MO4	AA	AB	BB	AA	AA	AC	BB	AA	BB
MO5	AA	BB	AA	AA	BB	AA	AA	BB	bb
MO6	AA	AA	AA	BB	BB	AA	BB	BB	AA
MO7	AC	AB	AD	AD	AC	AB	BC	AC	AD
MO8	AA	BB	BB	BB	AA	BB	AA	AA	BB

MinimalMarker による計算

計算結果

マーカー	品種 V01	V02	V03	V04	V05	V06	V07	V08	V09
MO3	AC	AB	AD	AD	AC	AB	BC	AC	AD
MO4	AA	BB	AA	AA	BB	AA	AA	BB	BB
MO5	AB	AA	BC	AB	AC	AA	AB	BC	AA

Q 9品種を判定するのに、すべてのマーカーは必要か？
最小限必要なマーカーの組み合わせはどれか？

マーカー数や品種数が増えると その組合せは莫大な量になる

↓

最少マーカーセット選択のための コンピュータプログラム MinimalMarker の利用

↓

3 つのマーカーですべての品種が判別可能なことがわかる

↓

時間とコストを節約できる どのような作物にも使える

くだものは食生活に豊かさと広がりを与え、また時には季節の移ろいを感じさせてもくれます。また近年はくだものの持つ健康機能性や癒し効果などにも注目が集まっています。果樹には特徴が大きく異なる多様な品種が存在し、その利用方法もさまざまです。

いろいろなくだものやその加工品を消費者の皆さんに安心して購入してもらうために、ここでご紹介したさまざまな方法を駆使して表示されたものが適正に流通していることを科学的に証明することが必要です。また、これらの品種を長年にわたって研究し、開発してきた多くの人々の権利を守るためにも、今後さらに多くの品種を正しく識別できる技術の開発を進めていきます。

参画機関

各樹種の品種識別は、農研機構果樹研究所と以下の研究機関との共同研究で得られた成果です。

福島県農業総合センター果樹研究所（モモ）
岐阜大学教育学部生物学教室（リンゴ）
山梨県果樹試験場（スモモ）
長崎県果樹試験場（ビワ）
静岡大学農学部（カンキツ）
種苗管理センター調査研究課（ナシ）
山形県立農業総合研究センター農業生産技術試験場（オウトウ）
和歌山県農林水産総合技術センター果樹試験場うめ研究所（ウメ）
千葉県農業総合研究センター（ビワ）

果樹研究所

問い合わせ先　果樹ゲノム研究チーム
029-838-6474（落葉果樹関係）・ 0543-69-7108（カンキツ）
発行年月：2006 年 11 月
発　　行：独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構　果樹研究所
住　　所：〒 305-8605　茨城県つくば市藤本 2 － 1
U　R　L：http://fruit.naro.affrc.go.jp/